

# **Modulation Bradykinin-induzierter Effekte in der pulmonalen Gefäßstrombahn durch Hemmung der NO-Synthase und Cyclooxygenase**

Experimentelle Untersuchungen an der isolierten und perfundierten Kaninchenlunge

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von      Markus Strauf  
aus                      Gießen

Gießen 2002

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin

Medizinische Klinik I

Leiter: Prof. Dr. med. H. Tillmanns

Klinische Pathophysiologie und Experimentelle Medizin

Leiter: Prof. Dr. med. H. Neuhof

des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. H. Neuhof

Gutachter: Prof. Dr. med. K. T. Preissner

Tag der Disputation: 01. Oktober 2002

**MEINEN ELTERN IN DANKBARKEIT GEWIDMET**

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Historischer Überblick	1
1.2	Einführung in das Kallikrein-Kinin-System	3
1.3	Bradykinin-Rezeptoren und Rolle des Gefäßendothels	8
1.4	Bradykinin-Interaktionen mit dem Arachidonsäuresystem – Bildung von Thromboxan A <sub>2</sub> und Prostazyklin	14
1.5	Bradykinin induzierte Wirkungen im kardialen und peripheren Gefäßsystem unter besonderer Beachtung seiner Autakoide	20
1.5.1	NO (Stickstoffmonoxid) und NO-Synthasehemmung	21
1.5.2	Prostazyklin (PGI <sub>2</sub> )	25
1.5.3	Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)	27
1.6	Effekte von Bradykinin und seiner Autakoide in der pulmonalen Strombahn	29
1.7	Klinische Interaktionen	32
1.8	Zielsetzung und Fragestellung	36
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>37</b>
2.1	Organentnahme	37
2.2	Perfusion der isolierten Lunge	39
2.2.1	Perfusionssystem	39
2.2.2	Perfusionslösung	40
2.2.3	Perfusionsmodus	42
2.3	Ventilationssystem	43
2.4	Messung des Pulmonalarteriellen Drucks (PAP)	43
2.5	Probenentnahme	46
2.6	Herstellung der Stammlösungen der verwendeten Pharmaka	46
2.7	Bestimmung der stabilen Metaboliten TXB <sub>2</sub> und 6-keto-PGF <sub>1α</sub>	50
2.8	Statistische Auswertung	51
2.9	Vorversuche	52
2.10	Versuchsreihen I – IV	53

---

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>57</b>
3.1	Vorversuche	57
3.1.1	Leerversuche	57
3.1.2	Dosisfindungsversuche	58
3.1.2.1	Bradykinin	58
3.1.2.2	L-NAME	59
3.2	Versuchsreihen I-IV	62
3.2.1	Reaktionen des Pulmonalarteriellen Drucks (PAP)	62
3.2.1.1	Wiederholte Bradykinin-Bolusapplikationen	62
3.2.1.2	Einfluß einer NO-Synthasehemmung (L-NAME)	64
3.2.1.3	Bradykinin-induzierter Effekt auf den PAP in Anwesenheit von L-NAME und nachfolgend Diclofenac	67
3.2.1.4	Bradykinin-induzierter Effekt auf den PAP in Anwesenheit von Diclofenac und nachfolgend L-NAME	69
3.2.2	Ausschüttung von Prostazyklin und Thromboxan A <sub>2</sub> infolge von Bradykinin-Stimulationen	72
3.2.2.1	Alleinige Bradykinin Stimulation	72
3.2.2.2	Einfluß von L-NAME	74
3.2.2.3	Einfluß von L-NAME und nachfolgend Diclofenac	79
3.2.2.4	Einfluß von Diclofenac und nachfolgend L-NAME	82
3.3	Gesamtübersicht über die in die statistischen Berechnungen eingehenden Mittelwerte nach Bradykinin-Stimulation	84
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>85</b>
4.1	Aktivierung des Arachidonsäuresystems	86
4.2	Bradykinin induzierte Druckreaktionen in der pulmonalen Strombahn	89
4.2.1	Lokale Bradykinin-Akkumulation unter ACE-Hemmern	91
4.2.2	Rolle der Applikationsgeschwindigkeit	94

---

4.3	Rolle des Thromboxan A <sub>2</sub> am PAP-Anstieg bei alleiniger Bradykinin-Applikation	95
4.4	Bedeutung des <i>direkten</i> Bradykinin-Effekts auf die glatte Gefäßmukulatur für den PAP-Anstieg	97
4.5	Mögliche Bedeutung weiterer Arachidonsäuremetaboliten am PAP-Anstieg	98
4.6	Vergleich Bradykinin-induzierter Effekte zwischen pulmonalen Arterien und Venen	100
4.7	Rolle des PGI <sub>2</sub> in der pulmonalen Gefäßstrombahn	101
4.8	Rolle von NO und seine Interaktionen mit TXA <sub>2</sub>	104
4.9	Abhängigkeit der Wirkungsintensität des NO vom Ausgangstonus	110
4.10	Einfluß der gewählten Versuchsmethodik auf die Interpretation der erhaltenen Ergebnisse	111
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUßFOLGERUNG</b>	<b>116</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>120</b>

## ABKÜRZUNGEN

<b>6-keto-PGF<sub>1α</sub></b>	6-keto-Prostaglandin F <sub>1α</sub>
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ACE</b>	Angiotensin-Converting-Enzym = Kininase II
<b>B<sub>1</sub> / B<sub>2</sub></b>	Bradykinin-Rezeptoren
<b>BK</b>	Bradykinin
<b>cAMP</b>	Adenosin-3',5'-monophosphat
<b>cGMP</b>	Guanyl-3',5'-monophosphat
<b>cNOS</b>	konstitutive NO-Synthase
<b>COX</b>	Cyclooxygenase
<b>DAG</b>	Diacylglycerin
<b>EDHF</b>	Endothelium-derived hyperpolarizing factor
<b>EDRF</b>	Endothelium-derived relaxing factor
<b>Flow</b>	Volumenstromstärke
<b>HMW</b>	High molecular weight
<b>iNOS</b>	induzierbare NO-Synthase
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositoltriphosphat
<b>LMW</b>	Low molecular weight
<b>L-NAME</b>	N <sup>ω</sup> -Nitro-L-Arginin-Methylester
<b>NO</b>	Nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
<b>o.g.</b>	oben genannte(r)
<b>PAP</b>	Pulmonalarterieller Druck
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostazyklin
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Thromboxan A <sub>2</sub>
<b>TXB<sub>2</sub></b>	Thromboxan B <sub>2</sub>
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>v.a.</b>	vor allem

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 HISTORISCHER ÜBERBLICK

Die medizinisch-pharmakologische Geschichte der Kinine reicht in den Beginn des 20. Jahrhunderts zurück. Einen zusammenfassenden Überblick über die historische Entwicklung der Pharmakologie der Kinine gibt die Übersichtsarbeit von REGOLI UND BARABÉ [152] aus dem Jahre 1980.

Die 1909 von Abelous und Bardier gemachte Beobachtung, daß intravenös injizierter Urin einen vorübergehenden Blutdruckabfall erzeugte, führte zur Entdeckung der Kinine. Zwischen 1920 und 1930 charakterisierten Frey, Kraut und Werle die hypotensiv wirkende Substanz und bezeichneten diese unter der Vorstellung, daß es sich um ein zirkulierendes Hormon handelt, zunächst als „Kreislaufhormon“. Da vor allem das Pankreas eine reichhaltige Quelle für die Substanz darstellte, wurde das Hormon in „Kallikrein“ (griech. für Pankreas) umbenannt. Werle und Mitarbeiter konnten ca. 1937 zeigen, daß Kallikrein im Plasma wiederum die Freisetzung eines pharmakologisch aktiven Stoffes bewirken konnte, der 1948 von Werle und Berek als „Kallidin“ bezeichnet wurde [73]. 1949 beschrieb Rocha e Silva, daß Trypsin und verschiedene Schlangengifte mit dem Plasmaglobulin reagierten und eine Substanz freisetzten, die einerseits zu einem systemischen Blutdruckabfall führte, andererseits eine langsame Kontraktion des Darms hervorrief. Dieser Substanz wurde daher der Name Bradykinin gegeben (griech.: *bradys* für langsam, *kinein* für bewegen). 1960 wurde von Elliot et al die vollständige Sequenz des Bradykinins beschrieben [73, 152]. Ab diesem Zeitpunkt gelang es, das als Nonapeptid identifizierte Hormon zu synthetisieren und für weiterführende klinisch-experimentelle Studien zur Verfügung zu stellen.



Im Rahmen von Synthetisierungsprozessen wurde kurze Zeit später Kallidin als Decapeptid identifiziert, das sich chemisch vom Bradykinin lediglich durch einen zusätzlichen Lysinrest unterschied (Abb. 1.1). Unklarheit herrschte lange Zeit über den Ursprungsort bzw. den Syntheseweg als auch über die genauen physiologischen und pathophysiologischen Wirkungen von Bradykinin.

1967 wurde von FERREIRA UND VANE [60] erstmals die Inaktivierung von Bradykinin in der Lunge beschrieben. Ab diesem Zeitpunkt wurde die zuvor vertretene Hypothese von im Kreislauf zirkulierenden Hormonen verworfen. 1980 konnten REGOLI UND BARABÉ [152] die inzwischen identifizierten Kininrezeptoren in zwei Subklassen unterteilen, die B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>-Rezeptoren. Mitte der 80er Jahre wurden von VAVREK UND STEWART [185] die ersten Bradykinin-Rezeptorantagonisten entwickelt, die in den folgenden Jahren immer spezifischer wurden und bei der Untersuchung über die genauen Wirkungseffekte bzw. -mechanismen des Bradykinins wichtige Erkenntnisse liefern konnten.

NAME	STRUKTUR	FUNKTION
Bradykinin	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg	B <sub>2</sub> > B <sub>1</sub>
Kallidin	<b>Lys</b> -Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg	B <sub>2</sub> ≡ B <sub>1</sub>
des-Arg <sup>9</sup> -Bradykinin	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe	B <sub>1</sub>
des-Arg <sup>10</sup> -Kallidin	<b>Lys</b> -Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe	B <sub>1</sub>
HOE 140	[D-Arg]-Arg-Hyp-Gly-Thi-Ser-Tic-Oic-Arg*	B <sub>2</sub> -Antagonist

**Abb. 1.1** Struktur der Kinin-Agonisten sowie dem BK-Antagonisten HOE 140, aufgelistet vom carboxyterminalen Ende. Kallidin und Bradykinin unterscheiden sich chemisch lediglich in einer „Lys“-gruppe. Die Wirkungsaktivität an den Bradykinin-Rezeptoren (B<sub>1</sub>/B<sub>2</sub>) ist rechts dargestellt.

\* Hyp: trans-4-Hydroxy-Pro; Thi: β-(2-Thienyl)-Ala; Tic: [D]-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin-3-yl-carbonyl; Oic: (3as,7as)-Octahydroindol-2-yl-carbonyl. (nach [73])

## 1.2 EINFÜHRUNG IN DAS KALLIKREIN-KININ-SYSTEM

Man unterscheidet heute ein plasmatisches Kallikrein-Kinin-System, das an der lokalen Regulation der Gerinnung beteiligt ist, von einem multiplen glandulären Kallikrein-System in fast allen exogenen Drüsen, Nieren, Gefäßen, Gehirn und Herz [16, 51, 69]. Dementsprechend lassen sich Plasmakallikrein und Gewebekallikrein differenzieren, die sich sowohl in ihren biochemischen als auch physiologischen Eigenschaften unterscheiden.

Die biologisch aktiven Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems sind die sog. Kinine, hochaktive Peptide von 8 bis 11 Aminosäuren mit einer Halbwertszeit in vivo von ca. 30 Sekunden, abhängig von Kinintyp und Spezies [60, 64, 152]. In der systemischen Zirkulation können nur minimale Mengen im picomolaren Bereich nachgewiesen werden [144]. Bradykinin und Kallidin sind die beiden wichtigsten Vertreter der Kinine [64, 69].

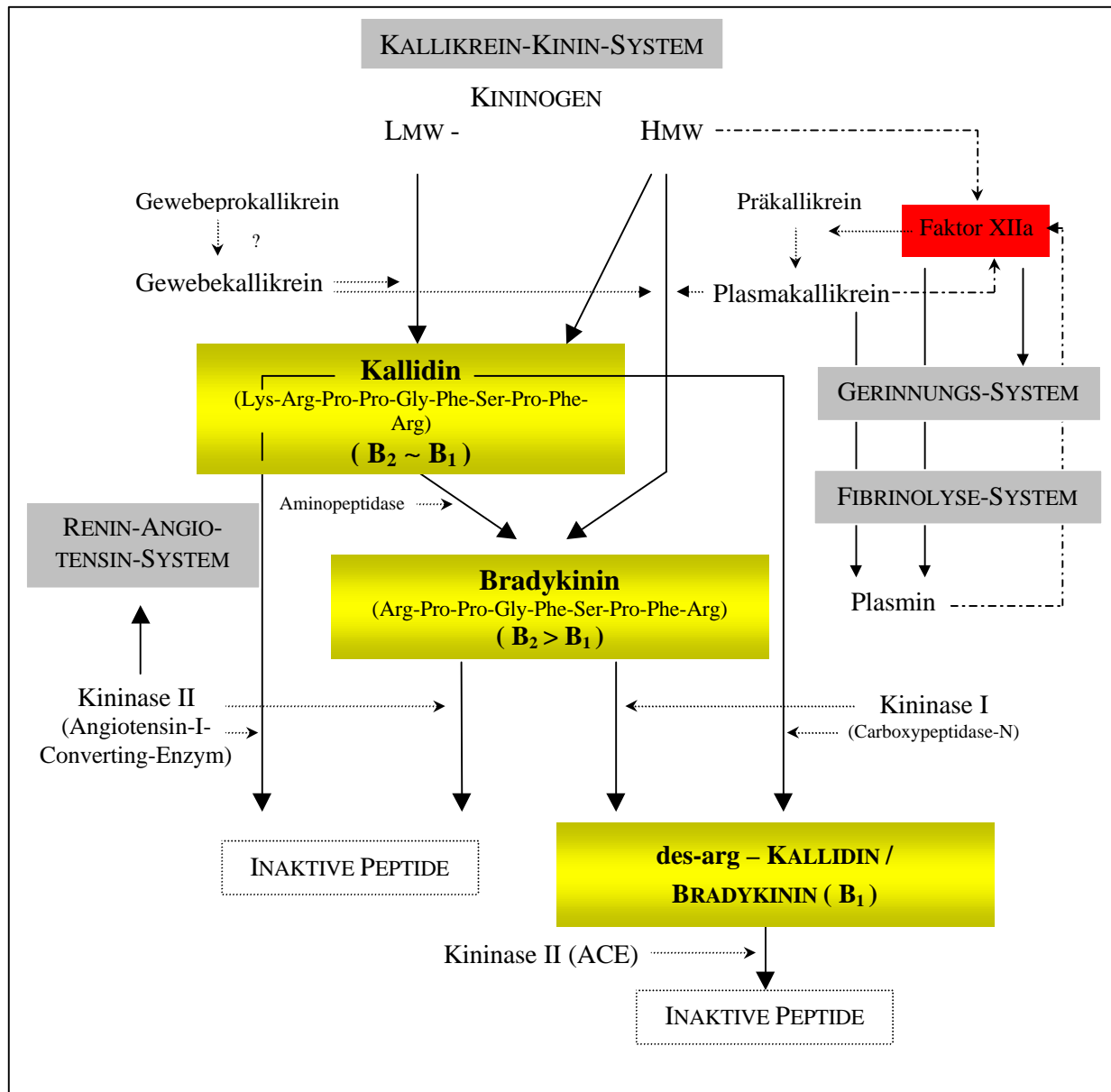
Ausgangspunkt der Kininkaskade des Kallikrein-Kinin-Systems und gleichzeitig Substrat für die Kallikreine sind hoch- (HMW-) und niedermolekulare (LMW-) Kininogene, die beide in der Leber synthetisiert werden.

Bradykinin entsteht zum einen unmittelbar aus der Reaktion von aktiviertem Plasmakallikrein mit HMW-Kininogen, außerdem auch über die Zwischenstufe des Kallidins. LMW-Kininogen ist ausschließlich für das Gewebekallikrein zuständig, es entsteht primär nur Kallidin [16, 133]. Das Decapeptid Kallidin besitzt eine vergleichbare Aktivität wie Bradykinin, muß für seine charakteristischen Effekte aber nicht erst in dieses umgewandelt werden. In geringen Mengen wird Kallidin durch Abspaltung eines Lysinrestes mittels einer Aminopeptidase in Bradykinin umgewandelt, jedoch ist diese Reaktion im Vergleich zu der Inaktivierungsrate durch die Hydrolyse nicht von großer Bedeutung.

Abgebaut wird das Bradykinin über verschiedene enzymatische Mechanismen. Wichtig ist zum einen der Abbau durch die Kininase II (Hydrolyse), eine Dipeptidylcarboxypeptidase, die mit dem Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) exakt identisch ist [47, 199]. Hauptlokalisationsorte der Kininase II sind die Lungenstrombahn und die Gefäße der Niere [32, 52]. Hier ist das Enzym in hohen Konzentrationen als sog. „Ektoenzym“ an der Oberfläche der Endothelzellen zu finden. BAKER ET AL [7] sowie RYAN [160] konnten übereinstimmend nachweisen, daß die Lunge eine sehr hohe Abbaukapazität für Bradykinin aufweist. 80-90% des Peptids werden im pulmonalen Gefäßbett während einer einzigen Passage abgebaut.

Einen zweiten wichtigen Abbauweg stellt die Kininase I (Arginincarboxypeptidase N) dar. Diese zirkuliert frei im Plasma und metabolisiert Bradykinin und Kallidin zu den biologisch noch aktiven Metaboliten des-arg<sup>9</sup>-Bradykinin bzw. des-arg<sup>10</sup>-Kallidin [51]. Das des-arg<sup>9</sup>-Bradykinin wird schließlich von der Kininase II weiter abgebaut.

Abb. 1.2 gibt einen zusammenfassenden Überblick über Entstehung und Abbau der Kinine sowie gleichzeitig eine Übersicht über die Interaktionen mit anderen vasoaktiven Systemen und der Blutgerinnung.



**Abb. 1.2 Schema zur Kininentstehung und Abbau**

Bradykinin und Kallidin entstehen durch Katalyse mit Kallikreinen. Beim Menschen wurden zwei unterschiedliche Kallikreine – das Plasma- und Gewebekallikrein – nachgewiesen. Das Präkallikrein und das HMW (high molecular weight)-Kininogen sind für die Aktivierung und Funktion des Faktors XII essentiell und gleichzeitig wichtige Faktoren der Gerinnungskaskade. Plasmakallikrein und der Faktor XII können sich gegenseitig aktivieren. Bradykinin und Kallidin werden durch die Kininase I zu den entsprechenden des-Arg-Metaboliten abgebaut. Diese Kinine sind potente Liganden am  $B_1$ -Rezeptor, nicht aber – wie die Muttersubstanzen – am  $B_2$ -Rezeptor.

Sowohl Bradykinin wie auch Kallidin werden durch die Kininase II (ACE) inaktiviert.

.....> katalysiert      - - - -> positive Rückkopplung

$B_1 / B_2$ : Wirkung am Rezeptortyp

Eigene Grafik [Quellen im Text]

Bevor in den nachfolgenden Abschnitten genauer auf die hämodynamische Funktion des Bradykinins eingegangen wird, sollen zunächst noch Eigenschaften, Wirkung und Interaktionen des **Kininogens** als Muttersubstanz des Bradykinins näher erläutert werden. Darüber hinaus sollen auch die biologischen Effekte des **Kallikreins** kurz dargestellt werden. Einen Überblick gibt diesbezüglich der 1997 von COLMAN UND SCHMAIER veröffentlichte Review-Artikel [209].

Kallikreine zirkulieren in einem inaktiven Zustand im Plasma und müssen durch andere Proteasen erst aktiviert werden. Die Kallikreine selbst haben unter den Proteasen wiederum die höchste Spezifität für die Abspaltung von Bradykinin und Kallidin aus den Kininogenen [73]. Kallikrein wird als der aktive Metabolit aus Präkallikrein freigesetzt, die Aktivierung erfolgt über den Faktor XIIa oder XII<sub>f</sub>. Kallikrein besteht nach der Aktivierung aus zwei Untereinheiten, einer schweren Kette von ca. 52 kD, sowie einer leichten Kette von entweder 33 kD oder 36 kD.

Die beiden Substrate des Kallikreins, das high molecular weight [HMW]- und low molecular weight [LMW]-Kininogen sind Produkte eines einzigen Gens und entstehen aus alternativer Prozessierung der mRNA [in 209]. HMW-Kininogen ist ein 120 kD  $\alpha$ -Protein, das LMW-Kininogen ein 66-kD- $\beta$ -Globulin. Biochemisch setzen sich beide Kininogene aus mehreren Domänen zusammen, denen jeweils eine bestimmte biologische Funktion zugeordnet ist.

Die Kininogene lassen sich in drei verschiedenen Anteile unterteilen. Eine in den Kininogenen enthaltene Bradykinin- bzw. Kallidinsequenz verbindet sog. schwere Ketten mit leichten Ketten. Das LMW-Kininogen unterscheidet sich vom HMW-Kininogen hinsichtlich seiner Struktur in den leichten Ketten.

Das HMW-Kininogen spielt eine wichtige Rolle im Kontaktsystem. Bindungsstellen für Kininogen sind auf der Zellmembran von z.B. Granulozyten, Thrombozyten und

Endothelzellen vertreten. Diese Bindungsstellen scheinen regulierbar, die Bindungsfähigkeit über verschiedene Pharmaka bzw. Inhibitoren beeinflussbar. Wie diese Bindungsstellen biochemisch genau aufgebaut sind, ist derzeit noch unklar.

Die Kininogene entfalten eine Reihe biologischer Aktivitäten, die sie entweder als Kininogene selbst oder nach Aktivierung durch Kallikreine bzw. den Faktor XII entfalten. Zusammen mit der Freisetzung von Bradykinin stellt das System u.a. einen wichtigen lokalen Regulator des Blutdrucks dar, desweiteren wird die Antithrombin- bzw. profibrinolytische Aktivität reguliert.

Hinsichtlich der Blutdruckregulation spielt die konsekutive Freisetzung von NO bzw. PGI<sub>2</sub> eine ganz wesentliche Rolle, hierauf wird im Verlauf dieser Einleitung noch ausführlich eingegangen. Bezüglich der Aktivierung von Blutplättchen zeigen Ergebnisse neuerer Arbeiten antiadhäsive sowie antiaggregatorischen Eigenschaften eines Proteolyseprodukts des HMW-Kiniogens auf, hier eröffnen sich evtl. neue Möglichkeiten in der antithrombotischen Therapie [210]. Auch im Fibrinolyse-System sind Kininogene und Kallikreine mittels Interaktionen und gegenseitiger Regulation beteiligt [in 209].

### 1.3 BRADYKININ-REZEPTOREN UND ROLLE DES GEFÄßENDOTHEL

Bisher konnten in zahlreichen Spezies einschließlich des Menschen zwei verschiedene Bradykinin-Rezeptoren sicher identifiziert werden, die als B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>-Rezeptoren bezeichnet werden [23, 76, 152, 158].

Der klassische Bradykinin-Rezeptor ist der B<sub>2</sub>-Rezeptor, dieser bindet selektiv Bradykinin und Kallidin und ist in den meisten Geweben existent. So auch in den pulmonalen Gefäßen des Menschen, sowohl in der glatten Muskulatur als auch im Endothel [76, 88, 119, 158, 180]. Der B<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelt fast alle Effekte des Bradykinins und Kallidins.

Der B<sub>1</sub>-Rezeptor bindet selektiv die des-Arg-Metaboliten von Bradykinin und Kallidin und ist in den meisten Geweben geringer vorhanden als der B<sub>2</sub>-Rezeptor. Infolge pathophysiologischer Reize wie Entzündungen, Traumata oder Gewebeverletzungen wird der B<sub>1</sub>-Rezeptor hochreguliert, es dominieren dann die B<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelten Effekte [48, 152].

Hinsichtlich ihres **biochemischen** Aufbaus gehören sowohl der B<sub>1</sub>- wie auch der B<sub>2</sub>-Rezeptor zu den G-Protein-gekoppelten Oberflächenrezeptoren. Aufgebaut sind beide Rezeptoren in Form eines ‚loops‘ mit insgesamt sieben Transmembran-Domänen. Entscheidende Unterschiede im Aufbau der beiden Rezeptoren finden sich neben den Liganden-Bindungsstellen v.a. im intrazellulären Anteil des Rezeptors [64].

*Übereinstimmend* kommt es bei beiden Rezeptoren über eine Anbindung an die gleiche G<sub>α</sub>-Untereinheit (G<sub>q</sub>) zu einer Phospholipase C-abhängigen Freisetzung von Inositolphosphat (IP) sowie einem Anstieg von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup>.

Über eine B<sub>2</sub>-Rezeptor-Aktivierung in den Endothelzellen führt dieser Ca<sup>2+</sup>-Anstieg dann über einer Stimulation der Phospholipase A<sub>2</sub> zu einer Aktivierung des

Arachidonsäure-Metabolismus wie in der **Abb. 1.4** grafisch dargestellt und im folgenden Abschnitt noch weiter erläutert wird.

*Unterschiede* zwischen den beiden Rezeptoren bestehen insbesondere hinsichtlich der funktionellen Antwort.

- Der **B<sub>2</sub>-Rezeptor** gehört zu den sogenannten „Recycling-Rezeptoren“, d.h. der Rezeptor spricht auf eine Stimulation mit einem intensiven, aber nur kurzen Signal an, um dann in Form einer Internalisierung bzw. anderer Abbauprozesse (Sequestration, Liganden-Dissoziation) für eine gewisse Zeit funktionslos zu werden. Die Signalübertragung wird auf diese Weise sehr rasch terminiert. Bei Langzeitstimulationen unterliegt der B<sub>2</sub>-Rezeptor einer Down-Regulation. Divergierend hierzu weisen allerdings neuere Versuchsergebnisse der Arbeitsgruppe um TSCHÖPE ET AL darauf hin, daß es z.B. bei dem akuten Myokardinfarkt im Rahmen eines „Reparaturmechanismus“ auch zu einer Up-Regulation von B<sub>2</sub>-Rezeptoren kommen kann [203].
- Der im Rahmen von inflammatorischen Prozessen exprimierte **B<sub>1</sub>-Rezeptor** wird v.a. durch Wachstumsfaktoren, Zytokine oder bakterielle Lipopolysaccharide induziert (Up-Regulation). Der B<sub>1</sub>-Rezeptor gehört zu den Rezeptoren, die keiner Internalisierung unterliegen. Bei Dauerstimulation des Rezeptors kommt es sogar zu einer vermehrten Expression. Somit ist eine dauerhafte Signalübertragung gewährleistet.

Die Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über Wirkung bzw. klinische Effekte der Bradykinin-Rezeptoren an verschiedensten Organsystemen.



WIRKUNG	KLINISCHER EFFEKT
<b>B<sub>1</sub>-Rezeptor</b>	
Wirkung an der glatten Muskulatur (Kontraktion / Relaxation)	Endotoxischer Schock
Stimulation sensorischer Neurone	[Chronischer-]Schmerz
Makrophagen	gesteigerte Produktion von IL-1 und TNF1 $\alpha$ ⇒ Unterhaltung eines Entzündungsreizes
kardioprotektiver Effekt (auch durch B <sub>2</sub> -Rezeptor [203])	bei myokardialer Ischämie: <ul style="list-style-type: none"> <li>• verbesserte myokardiale Reperfusion</li> <li>• verhindern von Reperfusionsarrhythmien</li> <li>• verbesserte myokardiale Kontraktion</li> <li>• positiver Einfluß auf Glukose- und Elektrolyt-Stoffwechsel u.a.</li> </ul>
<b>B<sub>2</sub>-Rezeptor</b>	
Freisetzung autokriner / parokriner Faktoren (z.B. NO / Prostaglandine / EDHF)	Vasodilatation, gesteigerte Gewebepерfusion, antithrombotische Effekte, antiproliferative Effekte u.a.
Gefäßmuskulatur-Relaxation	Vasodilatation, Tonus-Regulation
erhöhte Gefäßpermeabilität	Angioödem, entzündliches Ödem
Freisetzung von Histamin aus Mastzellen	Angioödem, entzündliches Ödem
Gewebeentzündung	Arthritis, Kolitis, Pankreatitis, ossäre Demineralisation und Knochenresorptionsstörungen
Stimulation sensorischer Neurone (Nozizeption)	[Akut-]Schmerz
Erregung sympathischer Nervenendigungen	Freisetzung von Katecholaminen
gesteigerter Glucosetransport in die Zelle	erhöhte Insulin-Sensitivität, verbesserte Glukose-Toleranz
Sensibilisierung der Atemwege	Husten, Bronchokonstriktion, allergische Rhinitis, Asthma
Nephrologische Wirkung	Regulation von Volumen und Zusammensetzung des Urins
Steigerung der Spermatogenese	Beeinflussung des männlichen Fortpflanzungssystems
Motilitätssteigerung der Spermien	
Beeinflussung der Blut-Hirn-Schranke	erhöhte ZNS-Penetration

**Tab. 1.1 Überblick über Wirkung und klinische Effekte von B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>-Rezeptoren [nach 16, 64, 69, 73]**

Einige Autoren vermuteten neben B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>-Rezeptoren die Existenz weiterer Bradykinin-Rezeptoren [55]. Wahrscheinlicher erscheint allerdings, wie REGOLI ET AL [154] 1993 in ihrer Übersichtsarbeit veröffentlichten, daß es sich bei diesen scheinbar „neuen“ Rezeptoren eher um bisher nicht bekannte Funktionen bzw. Subtypen der B<sub>1</sub>- und B<sub>2</sub>-Rezeptoren handeln könnte.

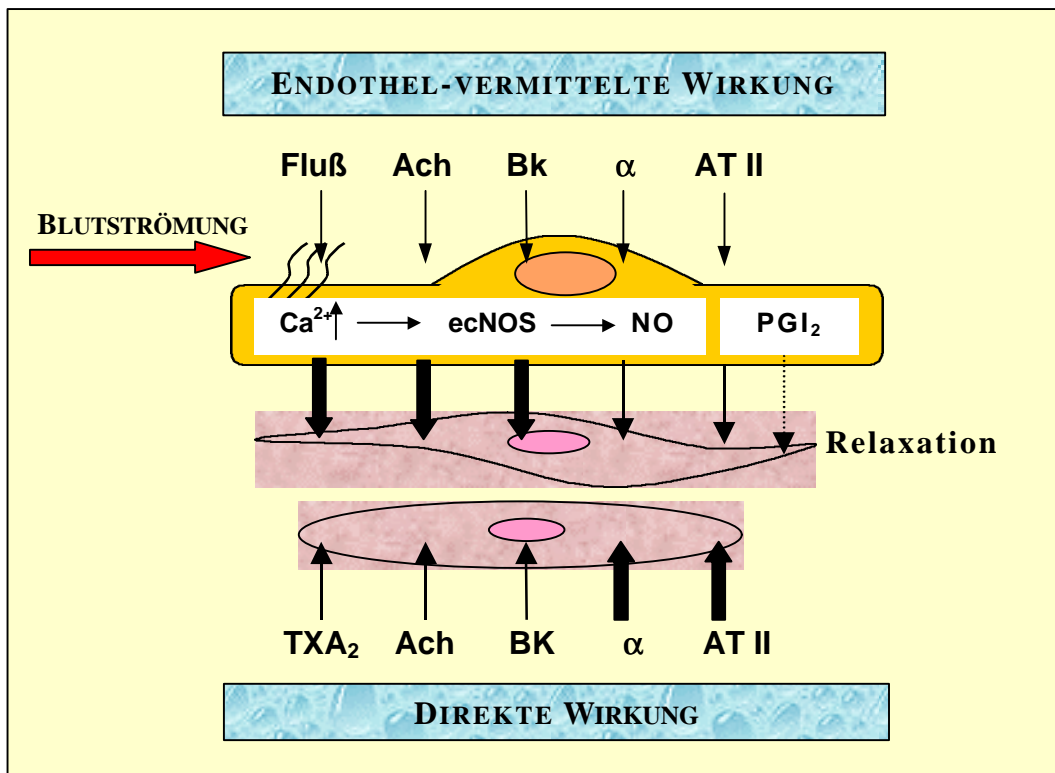
Zahlreiche experimentelle Arbeiten haben ergeben, daß es zwischen den Spezies Unterschiede im Ansprechen auf Bradykinin gibt. Der Kaninchenorganismus zählt

hier zusammen mit dem Hund zu den sensitivsten Spezies [9, 152]. REGOLI ET AL [153] haben 1994 neuere Untersuchungen hinsichtlich speziesspezifischer Unterschiede bzw. Subtypen von Bradykinin-Rezeptoren vorgestellt. U.a. wurden auch Vergleiche an der isolierten Pulmonalarterie durchgeführt. Hiernach scheinen die Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptorsubtypen von Mensch und Kaninchen weitgehend identisch zu sein und sich pharmakologisch z.B. von den B<sub>2</sub>-Rezeptoren von Ratte und Meerschweinchen zu unterscheiden. Ein vergleichbares Ergebnis erhielten GOBEIL ET AL 1996 [71]. Diese Autoren formulierten zusätzlich die Hypothese, daß die unterschiedliche Wirkungsintensität verschiedener Kinin-Analoga den divergierenden pharmakodynamischen Eigenschaften des B<sub>2</sub>-Rezeptors zuzuschreiben ist. Dies wurde von GOBEIL ET AL experimentell sowohl für in vivo- als auch in vitro-Verhältnisse gezeigt [71].

Im wesentlichen lassen sich drei große Hauptgruppen der Kinin-Wirkungen differenzieren: hämodynamische Effekte, metabolische Wirkungen und nicht zuletzt spielen die Kinine eine wichtige Rolle bei der klassischen Entzündungsreaktion [73, 120, 152]. Im Rahmen dieser Arbeit sollen v.a. die hämodynamischen Effekte des Bradykinins im Vordergrund stehen.

Der *direkte* Effekt des Bradykinins auf die glatte Muskulatur der Gefäße ist eine Kontraktion [2, 9]. Dies führt zur Vasokonstriktion von Gefäßen, deren Endothel entfernt wurde [2]. Eine Kontraktion als Reaktion auf Bradykinin, abgesehen von der glatten Gefäßmuskulatur, kommt in intestinalem, uterinem und tracheobronchialen Gewebe vor [69]. In der Regel spielen sich die physiologisch relevanten vasoaktiven Wirkungen des Bradykinins in Gefäßen ab, die über ein intaktes Endothel verfügen, auf deren Zelloberfläche ein B<sub>2</sub>-Rezeptor ausgebildet ist [35, 183]. 1999 beschrieben DREXLER ET AL in ihrer Übersichtsarbeit die Schlüsselrolle des vaskulären Endothels

in der lokalen Regulation des Gefäßtonus. Diese begründet sich durch die Freisetzung von vasodilatierenden und vasokonstriktiven Substanzen. Eine Dysfunktion des Endothels trägt entscheidend mit zur Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen bei [49] (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3** *Endothel- vermittelte und direkte Wirkungen von Mediatoren auf den Tonus der Gefäßmuskulatur.*

Bradykinin wirkt über (Endothel)-Mediatoren relaxierend, die direkte Wirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur ist allerdings eine Kontraktion. Auch eine Reihe weiterer Substanzen haben entgegengesetzte Wirkungen. In der Regel überwiegt bei Bradykinin der Endotheleffekt, so daß eine Relaxation resultiert. Die Pfeilstärke kennzeichnet den jeweils überwiegenden Effekt der verschiedenen Mediatoren. unter physiologischen Bedingungen.

Die Grafik zeigt außerdem verschiedene **Freisetzungsmechanismen für NO und PGI<sub>2</sub>**.

Der wesentliche Stimulus der basalen NO-Synthase ist die Auslenkung von Makromolekülen an der luminalen Oberfläche der Endothelzellen (///) mit wahrscheinlicher Öffnung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, ausgelöst durch die Blutströmung. Auch durch Agonisten kann die NO-Produktion induziert werden. Neben dem Bradykinin gibt es hier noch weitere Mediatoren, die rezeptorvermittelt den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom erhöhen und NO bzw. auch PGI<sub>2</sub> freisetzen.

PGI<sub>2</sub> wirkt sowohl als *Mediator* als auch *direkt* relaxierend auf die glatte Gefäßmuskulatur.

Fluß = Blutfluß / Scherkraft, Ach = Acetylcholin, Bk = Bradykinin,  $\alpha$  =  $\alpha_1$ -Agonisten, AT II = Angiotensin II, ecNOS = endotheliale konstitutive NO-Synthase, NO = nitric oxide, PGI<sub>2</sub> = Prostazyklin, TXA<sub>2</sub> = Thromboxan A<sub>2</sub>.

(modifiziert nach [69, 87])

#### 1.4 BRADYKININ-INTERAKTIONEN MIT DEM ARACHIDONSÄURESYSTEM – BILDUNG VON THROMBOXAN A<sub>2</sub> UND PROSTAZYKLIN

Rezeptorvermittelt ist Bradykinin in der Lage, Mediatoren freizusetzen, die zu unterschiedlichen Anteilen für die Wirkungsvermittlung des Peptids verantwortlich sind. Hierzu gehören die Arachidonsäure-Metaboliten TXA<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub> [11, 21, 36, 125, 134, 201, 202] sowie als weitere Mediatoren auch NO – auf das im Verlauf dieser Einleitung noch separat ausführlich eingegangen wird – sowie der erst seit einigen Jahren bekannte „Endothelium-derived hyperpolarizing factor“ (EDHF) [49].

Auf zellulärer Ebene ist der B<sub>2</sub>-Rezeptor G-Protein gekoppelt. Im folgenden soll auf die genaue Signalvermittlung des B<sub>2</sub>-Rezeptors eingegangen werden, da aus einer Aktivierung dieses Rezeptors eine Freisetzung der Arachidonsäure und deren – für diese Arbeit interessierenden – Metaboliten TXA<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub> resultiert.

Zur Ausschüttung der Arachidonsäure, die in veresterter Form als Phospholipid einen hohen Anteil an den Membranlipiden der Zellen hat, kommt es über drei verschiedene Wege:

1. Eine direkte Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub>, diese hydrolysiert die Esterbindung von Membranphospholipiden (besonders Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin), es kommt zu einer Freisetzung von Arachidonsäure [34].
2. Eine direkte Aktivierung der Phospholipase C [132], diese schneidet die Phosphodiesterbindung von Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat, es entsteht 1,2-Diacylglycerol unter Abspaltung von Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>). Mittels der Diacylglycerollipase sowie der Monoacylglycerollipase wird aus 1,2-Diacylglycerol dann Arachidonsäure freigesetzt [142].

3. Über eine Erhöhung der zytosolischen Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$  können die Phospholipasen  $\text{A}_2$  und C indirekt aktiviert werden [172].

Die so freigesetzte Arachidonsäure wird über verschiedene Enzymsysteme nun relativ schnell weiter metabolisiert: die **Cyclooxygenase**, die **Lipoxygenasen** sowie das **Cytochrom P450-System** [73]. Die verschiedenen Systeme sowie die beiden Arachidonsäuremetaboliten  $\text{TXA}_2$  und  $\text{PGI}_2$  sollen kurz vorgestellt werden.

- **CYCLOOXYGENASE**

Die Cyclooxygenase kommt in zwei Isoformen vor, Cyclooxygenase-1 und -2 ( $\text{COX-1}$  und  $\text{COX-2}$ ). Die  $\text{COX-1}$  erscheint bedeutender, da von den meisten Zellen konstitutiv exprimiert [172]. Die  $\text{COX-2}$  wird bei entzündlichen Zuständen durch Zytokine oder andere Entzündungsmediatoren induziert. Durch die Cyclooxygenaseaktivität entsteht das Prostaglandin  $\text{G}_2$  und hieraus über einen weiteren Metabolisierungsprozeß das Prostaglandin  $\text{H}_2$  ( $\text{PGH}_2$ ). Es handelt sich jeweils um chemisch instabile zyklische Endoperoxide. Das  $\text{PGH}_2$  ist die Muttersubstanz der Prostaglandine  $\text{D}_2$ ,  $\text{E}_2$  und  $\text{F}_2$  [16, 131]. Außerdem entstehen aus dem  $\text{PGH}_2$  über eine Prostazyklinsynthase das Prostazyklin ( $\text{PGI}_2$ ) sowie über eine Thromboxansynthase das Thromboxan  $\text{A}_2$  [135, 171].

Die einzelnen Abkömmlinge des Prostaglandins  $\text{H}_2$  unterscheiden sich nur in der Position der einzelnen Hydroxyl- bzw. Ketogruppen.

Prostazyklin und Thromboxan  $\text{A}_2$  sind zwei hochaktive, aber instabile Verbindungen.

### ◆ **Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)**

Thromboxan A<sub>2</sub> wurde erstmals aus Blutplättchen isoliert, es ist ein Hauptprodukt des Arachidonsäurestoffwechsels der Thrombozyten [79]. Thromboxan spielt eine wichtige Rolle bei zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen. Die Hauptaktivitäten des TXA<sub>2</sub> sind die Aktivierung der Thrombozytenfunktion und die Kontraktion glatter Muskulatur und die daraus folgende Thromozytenaggregation bzw. Vaso- und Bronchokonstriktion [14, 79]. Für die vorliegende Arbeit ist vor allem der potente vasokonstriktorische Effekt des Thromboxan A<sub>2</sub> von Bedeutung. Dieser Effekt des TXA<sub>2</sub> konnte sowohl in vitro als auch in vivo in zahlreichen Spezies nachgewiesen werden, u.a. auch für den menschlichen Organismus [14, 77, 155, 131].

Thromboxan A<sub>2</sub> wirkt – zusammen mit PGH<sub>2</sub> – G-Protein-vermittelt an dem sog. TP-Rezeptor und aktiviert die second messenger IP<sub>3</sub>, DAG und Ca<sup>2+</sup> [37, 73, 77, 165].

TXA<sub>2</sub> zerfällt nicht-enzymatisch durch eine spontane Hydrolyse in das stabile, aber inaktive Thromboxan B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>). Die Halbwertszeit T<sub>1/2</sub> beträgt 30 Sekunden [78].

### ◆ **Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>)**

Prostazyklin kann in zahlreichen Geweben synthetisiert werden, in erster Linie enthalten allerdings Endothelzellen die Prostazyklinsynthase [123, 127, 131, 172].

1984 beschrieben MENCONI ET AL die Prostaglandin-Produktion in drei verschiedenen Zelltypen nach Bradykinin-Stimulation: in Endothelzellen, Zellen glatter Muskulatur sowie Fibroblasten. PGI<sub>2</sub> war das am meisten freigesetzte

Prostaglandin, wobei die Endothelzellen wiederum den größten Anteil an der Prostazyklin-Produktion hatten [127].

PGI<sub>2</sub> hat, im Gegensatz zu anderen Prostaglandinen, kaum eine direkte Wirkung, potenziert dafür aber den Effekt anderer Mediatoren wie z.B. des Bradykinins.

Das PGI<sub>2</sub> bindet G-Protein-gekoppelt an sog. IP-Rezeptoren und aktiviert als second messenger die Adenylatcyclase mit konsekutiver Steigerung des cAMP [165].

Bei einer im Vergleich mit TXA<sub>2</sub> etwas längeren Halbwertszeit T<sub>1/2</sub> von 3 Minuten zerfällt auch PGI<sub>2</sub> durch eine spontane Hydrolyse zu 6-keto-PGF<sub>1α</sub>.

PGI<sub>2</sub> hat bei zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine wesentliche Bedeutung [73]. Der Arachidonsäuremetabolit hemmt zum einen sehr wirkungsvoll die Thrombozytenaggregation, darüber hinaus verhindert Prostazyklin die Kontraktion der vaskulären und bronchialen Muskulatur [131]. Aufgrund dieser Wirkungen gilt PGI<sub>2</sub> als funktioneller Antagonist zum TXA<sub>2</sub> [15]. Die Balance zwischen diesen beiden Eicosanoiden stellt somit sowohl einen wichtigen rheologischen als auch vasoaktiven Steuerungsmechanismus dar.

Eine Korrelation in der Ausschüttung der beiden Metaboliten konnte auch im pulmonalen Gefäßbett verschiedener Spezies gezeigt werden [107, 137, 140, 163, 170].



- **LIPOXYGENASEN**

Mittels 5- und 12- Lipoxygenasen wird die Arachidonsäure über Oxydationsprozesse der mehrfach vorhanden cis-Doppelbindungen zu sogenannten Hydroperoxyeicosatetraensäuren (HPETE) synthetisiert. Bei diesen Metaboliten befinden sich Hydroperoxygruppen in verschiedenen Positionen, abhängig vom Gewebetyp [135, 171]. Auch die HPETE sind chemisch instabil und können enzymatisch und nicht-enzymatisch in Hydroxyfettsäuren (HETE) umgewandelt werden. Mittels der 5-Lipoxygenase kommt es zur Bildung der Leukotriene (LT) [164], einer Gruppe teils hochreaktiver Substanzen, die vielfältige (patho-) physiologische Funktionen einnehmen. Beim Menschen verursachen Leukotriene im systemischen Kreislauf eine Hypotension, Koronararterien und die distalen Segmente von Pulmonalarterien können durch sehr geringe Konzentrationen von LTC<sub>4</sub> und LTD<sub>4</sub> verengt werden [13, 73]. Leukotriene sind außerdem an Entzündungsreaktionen sowie an der Vermittlung der Immunantwort beteiligt. Abgebaut werden die Leukotriene in der Lungen, den Nieren und der Leber [73].

- **CYTOCHROM P450**

Mittels des Cytochrom P450-Systems kann die Arachidonsäure ebenfalls weiter metabolisiert werden. Die genauen physiologischen Mechanismen sind diesbezüglich aber noch nicht endgültig geklärt [73].

Abb. 1.4 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die oben beschriebenen Interaktionen des Bradykinins mit dem Arachidonsäuresystem.

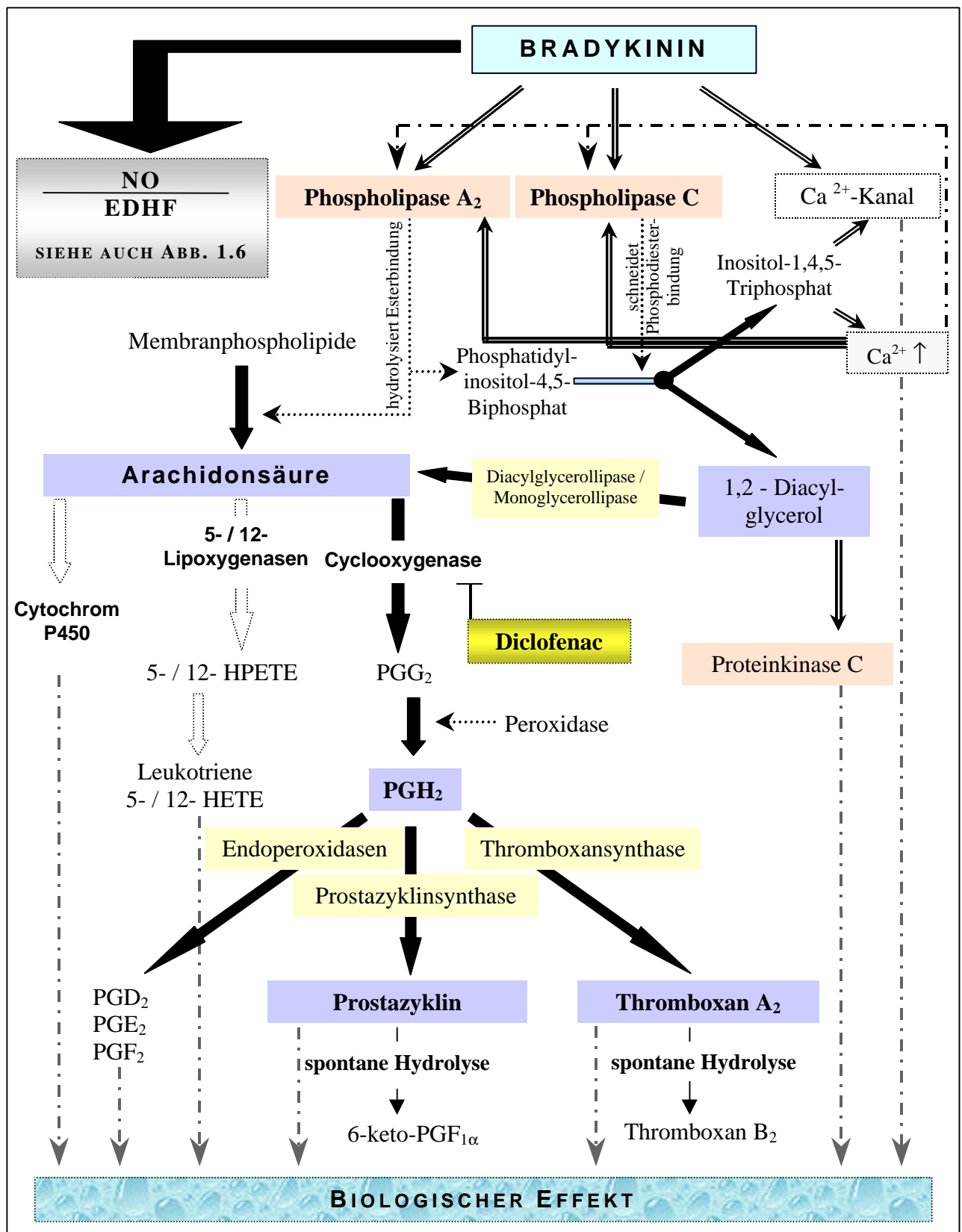


Abb. 1.4

**Interaktionen des Bradykinins mit dem Arachidonsäuresystem.**

Dargestellt ist die Freisetzung der Arachidonsäure aus Membranphospholipiden sowie die sich anschließenden Metabolisierungsschritte: der Cyclooxygenaseweg mit Bildung der Autakoide TXA<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub>, der Lipoxygenaseweg und der noch nicht vollständig geklärte Metabolismus über das Cytochrom P450-System. Nähere Erläuterungen im Text. Eigene Grafik [Quellen im Text]

### 1.5 BRADYKININ-INDUZIERTE WIRKUNGEN IM KARDIALEN UND PERIPHEREN GEFÄßSYSTEM UNTER BESONDERER BEACHTUNG SEINER AUTAKOIDE

PIPER UND VANE konnten Ende der 60er Jahre zeigen, daß Bradykinin in der Lage ist, vasoaktive Substanzen sowohl in der Lunge als auch im übrigen Gefäßsystem freizusetzen [148]. Im Laufe der folgenden Jahre wurden diese Substanzen als Prostaglandine identifiziert, eine heterogene Gruppe mit unterschiedlichen chemischen Strukturen und divergierenden (patho-)physiologischen Wirkungen [78, 184]. HAMBERG ET AL [79] beschrieben 1975 erstmals das Thromboxan A<sub>2</sub>, MONCADA ET AL [129] publizierten 1976 eine Arbeit mit der Erstbeschreibung des Prostazyklins. Das pharmakologische Wirkprinzip der bereits seit mehr als 150 Jahren bekannten und über lange Zeit lediglich empirisch medizinisch angewendeten „NO-Substitution“ mittels Nitroglycerin bzw. Amylnitrit wurde auf der Basis einer Entdeckung von FURCHGOTT UND ZAWADZKI aus dem Jahre 1980 erklärbar [66]. Sie beobachteten, daß Gefäße unter Acetylcholin nur dilatieren, wenn das Endothel intakt ist. Der von ihnen postulierte „Endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) wurde 1987 von PALMER ET AL als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert [143], zahlreiche weitere Autoren konnten dies an verschiedenen Spezies bestätigen. [61, 93, 94, 95].

Um die kardiovaskulären Effekte und insbesondere die zugrunde liegenden Wirkmechanismen des Bradykinins aufzuklären, wurden zahlreiche experimentelle Arbeiten an verschiedenen Tierspezies durchgeführt. Aber auch der menschliche Organismus war Gegenstand in der Erforschung der systemischen Kinin-Effekte [18, 19, 20]. Trotz der verschiedenen beschriebenen Rezeptoreigenschaften bzw. deren unterschiedlichen Sensitivität weisen diese Versuche hinsichtlich der Wirkung von Bradykinin im Blutkreislauf übereinstimmende Resultate auf: Bradykinin ist ein potenter Vasodilatator, der an den Arteriolen des großen Kreislaufs eine sofortige

Vasodilatation bewirkt [18]. Folge ist ein abrupter Abfall von systolischem und diastolischem Blutdruck mit reaktivem Anstieg der Herzfrequenz. Für den Menschen wurde dies von BÖNNER ET AL [22] an gesunden Probanden gezeigt.

Verantwortlich für die durch Bradykinin induzierte vasodilatative Reaktion werden drei verschiedene Mediatoren gemacht: NO, PGI<sub>2</sub> sowie EDHF [42, 96].

Nachfolgend soll auf diese Bradykinin-Autakoide zunächst hinsichtlich ihrer relativ gut erforschten vaskulären Effekte in der **kardialen und peripheren** Zirkulation eingegangen werden.

### 1.5.1 NO (STICKSTOFFMONOXID) UND NO-SYNTHASEHEMMUNG

NO bzw. EDRF ist im Endothel von Gefäßstrombahnen nahezu aller Spezies vorhanden. NO ist ein potenter, endogener Vasodilatator, der von Endothelzellen produziert und freigesetzt wird. Von PALMER ET AL wurde dies 1987 für menschliche Endothelzellen gezeigt [143]. Übereinstimmend wurde bisher von den meisten Autoren als Voraussetzung für eine NO-Freisetzung ein *intaktes* Endothel angenommen [2]. Die Resultate einer neueren Arbeit von THEIS ET AL [178] von 1998 weisen allerdings darauf hin, daß gerade in der pulmonalen Strombahn durch Bradykinin auch eine „außerendotheliale“ NO-Freisetzung induziert werden kann.

Die Halbwertszeit des NO ist mit 6-50 Sekunden sehr kurz. Dennoch vermittelt Stickstoffmonoxid eine Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse in nahezu allen Organsystemen des Körpers [130]. Einen Überblick geben diesbezüglich die Arbeiten von JOHNS [97] und MARIN UND SANCHEZ-FERRER [121].

Substrat für die zelluläre Produktion des Stickstoffmonoxids ist die Aminosäure L-Arginin. Die NO-Synthase (NOS) katalysiert enzymatisch aus dem Arginin die

Bildung von Citrullin unter Abspaltung von NO. Dieses wird sehr schnell zu Nitrit und Nitrat oxidiert. Die NO-Synthase kann in drei Isoenzyme unterteilt werden:

- ◆ die konstitutive *ncNOS*, die vorwiegend im Nervengewebe zu finden ist,
- ◆ die konstitutive *ecNOS*, die sich vorwiegend im Endothel befindet,
- ◆ die induzierbare *iNOS*, die nur vorübergehend gebildet wird z.B. bei Entzündungsprozessen.

Die Regulation der endothelialen NO-Bildung verläuft über eine Steuerung der Aktivität der *ecNOS* durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die mit Calmodulin einen enzymaktivierenden Komplex bilden.

Es gibt mehrere Stimuli, die über eine Aktivierung der *ecNOS* zu einer Freisetzung der endothelialen NO führen (siehe auch Abb. 1.3):

- Ein wesentlicher Stimulus ist die blutströmungsabhängige Aktivierung. Man nimmt an, daß es wahrscheinlich durch eine mechanische Auslenkung von Makromolekülen an der Endotheloberfläche zu einer Öffnung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und in Folge dann zu einer Aktivierung der *ecNOS* kommt [30, 166]. Somit kann der Basaltonus der Gefäße – in Form einer Autoregulation – über vom Blutstrom ausgeübte Scherkräfte angepaßt werden. Dieser Effekt ist klinisch bei der arteriellen Hypertonie von Bedeutung und ist nach neuesten Erkenntnissen durch körperliche Aktivität verstärkt induzierbar [31, 200].
- Rezeptorvermittelte NO-Freisetzung durch Mediatoren wie Acetylcholin, Thrombin und v.a. auch Bradykinin über den  $\text{B}_2$ -Rezeptor. Dies konnte auch an isolierten menschlichen Endothelzellen gezeigt werden [195].

Die zellulären Mechanismen, über die Bradykinin die Freisetzung des NO induziert, werden in der Übersichtsarbeit von BUSSE ET AL zusammenfassend dargestellt [30]. Nach initialer Aktivierung der Phospholipase C durch Bradyki-

nin kommt es zu einer vermehrten  $\text{IP}_3$ -Bildung. Hieraus resultiert eine Mobilisation von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Depots und damit eine Erhöhung der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Zugleich kommt es noch zu einer Steigerung des Einstroms von transmembranösem  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle und infolge des erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels dann zu der eNOS-Aktivierung.

- Weiterführende Untersuchungen konnten zeigen, daß sowohl beim Menschen als auch anderen getesteten Spezies Endothelzellen in der Lage sind, in Form einer autokrinen bzw. parakrinen Funktion selbständig Bradykinin zu produzieren und in den Extrazellularraum abzugeben [87]. Hierüber kommt es in Form einer Eigenstimulation dann zu einer Freisetzung von NO und Prostazyklin und damit zu einer Autoregulation des Gefäßwiderstandes und infolgedessen des Blutdrucks. U.a. für die Steuerung des vasomotorischen Tonus der Koronargefäße scheint dieser Mechanismus von Bedeutung [74, 87, 195]. WIEMER ET AL [195] vermuteten, daß die ACE-Hemmern über eine Verstärkung dieses Effektes einen Teil ihrer therapeutischen, antihypertensiven Wirkung entfalten. EVANS ET AL [53] sowie BUGA ET AL [27] nahmen darüber hinaus einen negativen Feedback-Mechanismus in den Endothelzellen an, durch den NO über eine Stimualtion der löslichen Guanylatcyclase seine eigene Freisetzung hemmt und so ebenfalls zu einer Autoregulation des Gefäßtonus beiträgt.

Als kleines, gut diffusibles Molekül passiert NO mühelos Zellmembranen. In der Zielzelle wird die durch NO verursachte Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur über eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase erreicht, die die Bildung von zyklischem Guanosin-Monophosphat (cGMP) aus Guanosin-Triphosphat (GTP) be-

wirkt. cGMP ist dann wiederum als second messenger in der Lage, Ionenkanäle, Proteinkinasen und Phosphodiesterasen zu regulieren [26, 53, 92].

Zur **Hemmung der NO-Aktivität** stehen mehrere Substanzen zur Verfügung, die entweder Menge, Aktivität oder Substrat der NO-Synthase beeinflussen.

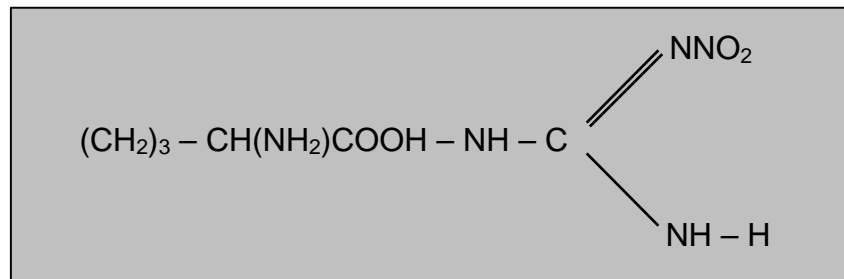
- ◆ So kann zum einen die Aufnahme von L-Arginin in die Zelle durch Aminosäuren wie z.B. Ornithin oder Lysin kompetitiv gehemmt werden.
- ◆ Als *intrazelluläre kompetitive* Substrate zum L-Arginin stehen Analoga wie z.B. L-NMMA (L-Nitroarginin-Methylester), ADMA (asymmetrisches Dimethylarginin), das auch im Körper selbst gebildet wird, oder das im Rahmen dieser Arbeit in den Versuchsreihen eingesetzte L-NAME ( $N_{\omega}$ -Nitro-L-Arginin-Methylester) zur Verfügung.
- ◆ In experimenteller Erprobung sind darüber hinaus direkte NO-Synthasehemmer, außerdem ist die Expression des NOS-Gens durch verschiedene Pharmaka, u.a. durch Dexamethason blockierbar. Auch die Oxygenierung des Gewebes hat aufgrund möglicher Radikalbildung eine Rückwirkung auf den NO-Gehalt [87].

Für einen klinischen Einsatz – z.B. beim septischen Schock – wären v.a. selektive Hemmer der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) von Bedeutung, die die basale NO-Produktion über die ecNOS nicht beeinflussen. Allerdings befinden sich solche hochselektiven iNOS-Hemmer derzeit noch in der pharmakologischen Entwicklung bzw. Erprobung [173].

Das in dieser Arbeit verwendete L-NAME ( $N_{\omega}$ -Nitro-L-Arginin-Methylester, Abb. 1.5) gehört in die Gruppe der selektiven Hemmer der ecNOS-Synthase.

Mittels Versuchen an der pulmonalen Strombahn der Katzenlunge verglichen DEWITT ET AL 1997 die hemmende Potenzen verschiedener kompetitiven NO-

Synthasehemmer (u.a. auch L-NAME) miteinander, ohne wesentliche Unterschiede in der Wirkungseffektivität feststellen zu können [44]. MCMAHON ET AL [126] charakterisierten L-NAME als potenten und selektiven NO/EDRF-Synthase-Hemmer im pulmonalen Gefäßbett.



**Abb. 1.5** Chemische Struktur von L-NAME.

Durch den Einsatz von NO-Synthasehemmern konnte am intakten Organismus – übereinstimmend für zahlreiche Spezies – indirekt die gefäßrelaxierende Wirkung von NO nach Bradykinin-Applikationen im peripherem Blutkreislauf nachgewiesen werden [62, 126, 188, 193], u.a. auch für die Kaninchenzirkulation [147].

In den zitierten Arbeiten bewirkte bereits die alleinige NO-Synthasehemmung jeweils signifikante Anstiege im systemischen Blutdruck. Dies deutet darauf hin, daß NO bei den genannten Spezies in Form einer tonischen Freisetzung entscheidend mit zur Aufrechterhaltung des Grundtonus in der Gefäßbahn beiträgt.

### 1.5.2 PROSTAZYKLIN (PGI<sub>2</sub>)

Vergleichbare Freisetzungsmechanismen wie für das Stickstoffmonoxid werden auch für die Produktion und Ausschüttung des zweiten wichtigen Bradykinin-Autakoids, das Prostazyklin, beschrieben. Neben physikalischen Einflüssen wie den Scherkräften des Blutflusses oder einer Hypoxie erfolgt eine Stimulation auch durch Pharmaka



wie Acetylcholin, ATP und Bradykinin [30, 87, 194]. Auf zellulärer Ebene scheint die *intrazelluläre*  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration eng korreliert mit der Produktion des  $\text{PGI}_2$ , wohingegen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle wahrscheinlich ein wesentliches Signal für eine anhaltende EDRF bzw. NO-Freisetzung darstellt [30].

Bradykinin triggert die Freisetzung von Prostaglandinen, je nach Organ bevorzugt  $\text{PGE}_2$  oder Prostazyklin ( $\text{PGI}_2$ ) [21, 125]. Für das  $\text{PGI}_2$  wurde dies am menschlichen Organismus durch in vivo-Versuche an gesunden Probanden von BARROW ET AL [11] gezeigt. Übereinstimmend konnte in zahlreichen Spezies nachgewiesen werden, daß  $\text{PGI}_2$  im systemischen Kreislauf an der durch Bradykinin induzierten Vasodilatation, und damit einem Blutdruckabfall, beteiligt ist. Dies konnten KADOWITZ ET AL [98] bzw. KADOWITZ UND SPANNHAKE [102] bereits kurz nach Identifizierung des Prostazyklins mittels systemischer Cyclooxygenasehemmung zeigen. Nicht ganz eindeutig ist allerdings der *Anteil*, den der Arachidonsäuremetabolit an der Vasodilatation hat.

BÖNNER ET AL vermuteten in einer 1994 veröffentlichten Übersichtsarbeit unter Zusammenschau der bis zu diesem Zeitpunkt bekannten experimentellen Ergebnisse, daß eher das NO *überwiegend* für die durch Bradykinin induzierte Blutdrucksenkung verantwortlich ist, während das  $\text{PGI}_2$  *überwiegend* metabolische Effekte vermittelt [16].

So verhindern Kinine über  $\text{PGI}_2$  vermutlich den raschen Abbau von energiereichen Phosphaten in den Myokardzellen und führen dadurch zu einer besseren Überlebensrate des Myokards nach regionaler Ischämie [114]. Eine weitere Rolle spielt das durch Bradykinin freigesetzte  $\text{PGI}_2$  bei Reperfusionsarrhythmien sowie bei der Aufrechterhaltung der koronaren Mikrozirkulation [16]. Vasodilatierende Effekte des Bradykinins in der koronaren Zirkulation werden dagegen maßgeblich durch NO

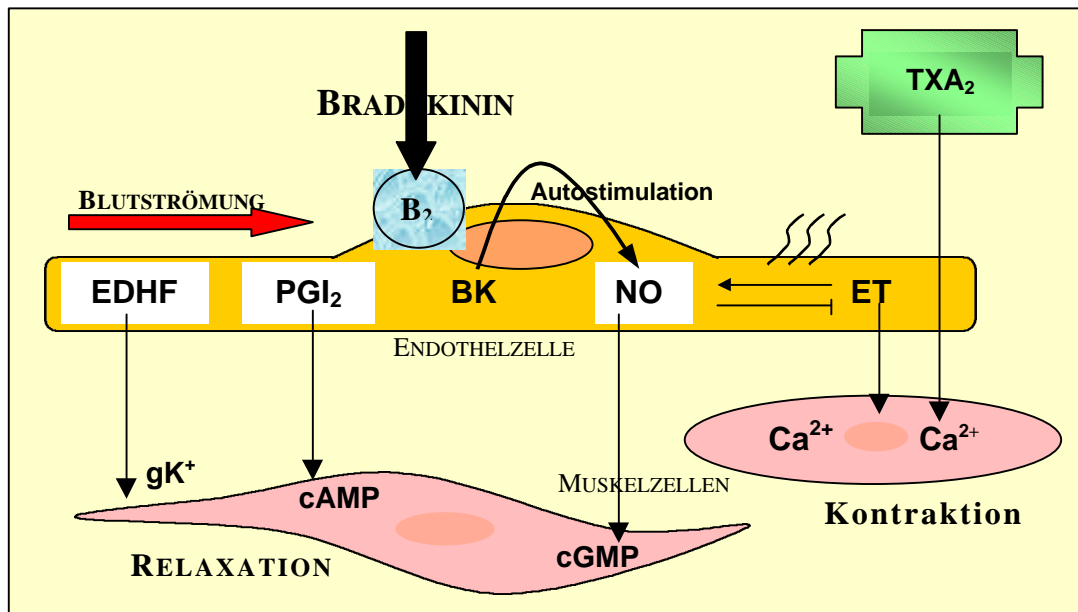
vermittelt, die Koronargefäße sind eine der sensitivsten Regionen des Körpers hinsichtlich des Ansprechens auf Bradykinin [64, 69].

### 1.5.3 ENDOTHELIUM-DERIVED HYPERPOLARIZING FACTOR (EDHF)

Aufgrund der Erkenntnisse des letzten Jahrzehnts scheint ein weiterer Mediator an der Regulation des Gefäßtonus im kardiovaskulären System beteiligt. Wie FELETOU UND VANHOUTTE 1999 [59] in ihrer Übersichtsarbeit beschrieben haben, kann die vom Endothel abhängige Gefäßrelaxation nicht vollständig durch die Freisetzung von NO und bzw. oder  $\text{PGI}_2$  erklärt werden. Eine weitere Substanz, der sogenannte „Endothelium-derived hyperpolarizing factor“ (EDHF) scheint ebenfalls eine gefäßaktive Rolle zu spielen. Nach den bisherigen Resultaten kommt der EDHF neben dem Menschen auch in zahlreichen Tierspezies vor, ein Wirkungsmaximum soll dieser Faktor insbesondere in kleinen Arterien über eine Hyperpolarisierung der glatten Gefäßmuskulatur entfalten [59, 156] (Abb. 6a und b).

Wie experimentelle Untersuchungen zeigen konnten, hängt es von der Organlokalisation ab, ob bzw. in welchen Ausmaß die oben beschriebenen Mediatoren nach Bradykinin-Stimulation zur Ausschüttung kommen bzw. welche Wirkung diese entfalten. So zeigten TODA ET AL [179] an isolierten Gefäßen des Hundes, daß es in den Koronargefäßen nach Bradykiningabe zu einer ausschließlich durch NO bedingten Relaxation der Koronargefäße kam, in den renalen Gefäßen wurde diese durch NO und Prostazyklin vermittelt, während in den Mesenterialvenen die Relaxation alleine von aus dem Endothel und subendothelialen Gewebe freigesetzten  $\text{PGI}_2$  induziert wurde [179].

Einen zusammenfassenden Überblick über die Freisetzung der Bradykinin-Autakoide und deren Wirkungsmechanismen geben die Abb. 1.6 a und b.



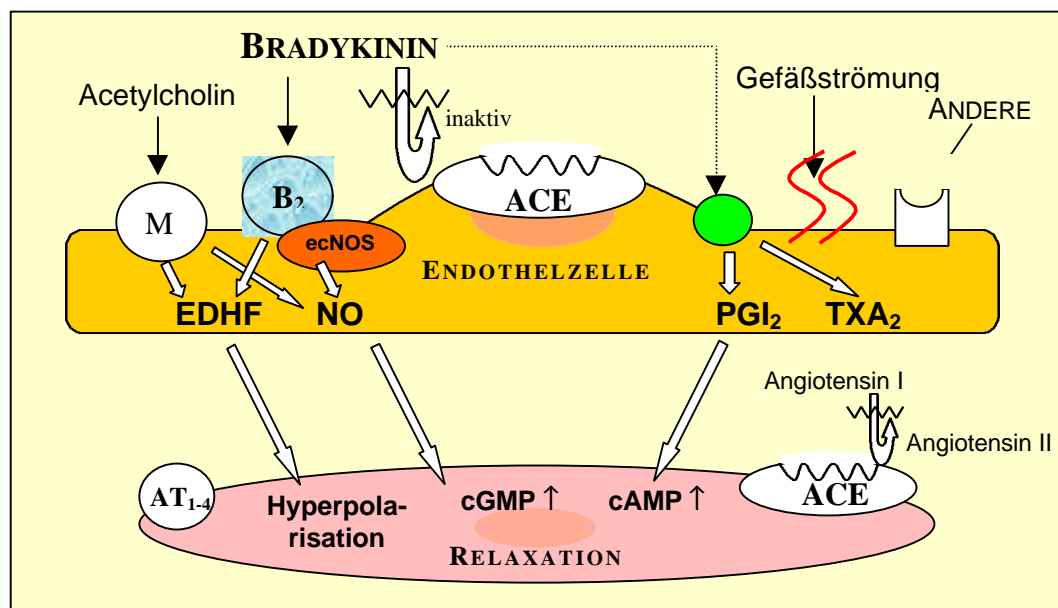
**Abb. 1.6 a) u. b)** Endotheliale Mediatoren des Bradykinins und ihre funktionellen Interaktionen (a) und (b). Das Endothel nimmt eine wichtige Rolle als „Empfänger“ und „Vermittler“ von Signalen wahr. Wichtige (physiologische) Antagonisten einer Relaxation sind das Endothelin (ET) sowie das  $\text{TXA}_2$ . Auf zellulärer Ebene wird bei diesen Substanzen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung induziert.

Beachtenswert ist die vermutete autokrine „Eigenstimulation“ mit in der Endothelzelle synthetisiertem Bradykinin (a).

In (b) sind die jeweiligen 2nd-messenger auf zellulärer Ebene dargestellt. Durch eine ACE-Hemmung (VWV) wird die Konzentration und Verweildauer des Bradykinins am Rezeptor erhöht.

$\text{gK}^+ = \text{K}^+$ -Kanal, M = Muscarin-Rezeptor

modifiziert nach [69, 87].



**Abb. 1.6 b**

## 1.6 EFFEKTE VON BRADYKININ UND SEINER AUTAKOIDE IN DER PULMONALEN STROMBAHN

Der Effekt von Bradykinin in der pulmonalen Strombahn ist seit Jahren Gegenstand sehr unterschiedlicher experimenteller Fragestellungen. Allerdings wird die Wirkung des Peptids auf die pulmonale Gefäßstrombahn in der Literatur sehr kontrovers diskutiert und ist letztlich bisher nur unzureichend bekannt. Die Datenlage reicht von einer Erhöhung der Gefäßresistenz bzw. einem PAP-Anstieg [25, 139, 169], keiner Reaktion auf das Peptid [45] bis zur Reduzierung des Gefäßtonus auf eine Bradykinin-Applikation [65, 117, 162].

Untersuchungen über Bradykinin-Effekte in der pulmonalen Zirkulation des intakten Tiers bzw. auch am isolierten Organ werden aufgrund der sehr schnellen Inaktivierung des Peptids erschwert. Hinzu kommen Interaktionen mit anderen hormonellen Systemen [28, 142] (Abb. 1.2), die – je nach gewählter Versuchsmethodik – die Ergebnisse beeinflussen können.

BÖNNER ET AL postulierten 1990, daß Kinine beim Menschen in vivo im pulmonalen Stromkreislauf keine spezifische Wirkung entfalten [18, 19]. Die menschliche Lunge dient nach Vorstellung dieser Autoren nur als „Inaktivierungsorgan“ des zirkulierenden Bradykinins, sie soll die arteriellen Gefäße vor unerwünscht hohen Kininkonzentrationen schützen. Allerdings waren MAK ET AL [119] 1991 in der Lage, mittels autoradiographischer Darstellung in vitro u.a. in den menschlichen Pulmonalgefäßen aller Größen  $[^3\text{H}]$ -Bradykinin-Rezeptorbindungsstellen zu identifizieren. Der Einsatz von Antagonisten, und hier insbesondere die Entwicklung von HOE 140 (Struktur siehe Abb. 1.1), konnte indirekt ebenfalls das Vorhandensein von  $\text{B}_2$ -Rezeptoren in der pulmonalen Strombahn bestätigen. Aufgrund der nachgewiesenen hohen Dichte der Rezeptoren in den Lungengefäßen wird – konträr zu den Ansichten von BÖNNER ET AL – vermutet, daß Bradykinin durchaus eine

wesentliche Rolle in der Regulation des pulmonalen Blutflusses spielen könnte [105, 119, 197].

Einen Hinweis auf die Komplexität des Bradykinins in der pulmonalen Strombahn gibt die Arbeit von KEMP ET AL [105]. Die Autoren konnten zeigen, daß es deutliche regionale Unterschiede auf das Ansprechen von Vasokonstriktoren bzw. -dilatoren *innerhalb* eines Organs gibt.

Die genaue Bedeutung von NO im pulmonalen Gefäßbett ist ebenfalls noch unklar.

Sicher ist, daß auch pulmonale Gefäße aus dem Endothel sowohl NO als auch PGI<sub>2</sub> freisetzen können [46, 91]. Welche Rolle NO allerdings insbesondere bei der Regulation von normalem bzw. auch einem pathophysiologisch erhöhten Tonus der glatten Gefäßmuskulatur spielt, ist auch noch in neueren Arbeiten Gegenstand kontroverser Diskussionen [91].

Spezies- und modellspezifisch gibt es einerseits Hinweise darauf, daß NO nicht oder nur unwesentlich für die Aufrechterhaltung des basalen Gefäßtonus in der Lunge verantwortlich ist [44, 81, 103]. Andere Arbeiten können genau das Gegenteil zeigen. Hier ist das NO, ebenso wie in der systemischen Zirkulation, maßgeblich an der Regulation des basalen pulmonalen Tonus verschiedener Spezies – einschließlich des Menschen – beteiligt [40, 177].

Weitgehend übereinstimmend scheint sich allerdings abzuzeichnen, daß dem Stickstoffmonoxid eine bedeutende Rolle bei der Modulation des Gefäßtonus unter (chronisch) hypoxischen Bedingungen zukommt [91, 103, 145]. Eine Freisetzung von NO kann nach neuesten Untersuchungen von IGARI ET AL [91] wohl auch bei kurzzeitigen hypoxischen Phasen schnell induziert werden, was zu einer biphasischen Druckantwort führt (initial ein PAP-Anstieg gefolgt von einem PAP-Abfall).

Interessant ist die Fragestellung nach der genauen Wirkungsweise des NO aufgrund der klinischen Relevanz für die pulmonale Hypertonie. Für dieses Krankheitsbild wird eine regionale Funktionsstörung der Lunge aufgrund eines NO-Mangels angenommen, evtl. in Kombination mit einem möglicherweise ebenfalls zu geringen Prostazyklinspiegel. Welcher der beiden Autakoide den größeren Anteil hat, ist noch Gegenstand klinischer Forschung [46] und ist wegen daraus erwachsender Therapiemöglichkeiten für die praktische pharmakologische Anwendung von Bedeutung.

Neben den Unklarheiten über die Rolle des NO bezüglich seiner Regulierungsaktivitäten des pulmonalen Gefäßtonus sind auch die genauen Mechanismen bzw. beteiligten Metaboliten an der Vermittlung von Bradykinin-Aktivitäten in der Lungenstrombahn nicht sicher bekannt. Insbesondere wird diskutiert, ob auch in der Lunge Bradykinin-Effekte über Mediatoren wie NO und Prostazyklin übertragen werden.

Können die vasodilatatorischen Reaktionen bzw. pulmonalarteriellen Druckabfälle in der Lungenstrombahn – vergleichbar mit den Reaktionen in der peripheren Zirkulation – noch durch eine Freisetzung von NO und PGI<sub>2</sub> erklärt werden [67, 117, 162], so sind die von SEEGER ET AL [169], BREIL ET AL [25] oder NOSSAMAN ET AL [139] beschriebenen Anstiege des pulmonalarteriellen Gefäßwiderstandes nach Bradykinin-Stimulationen nicht durch diese Mediatoren erklärbar.

SEEGER ET AL machten für den Anstieg der Gefäßresistenz Thromboxan A<sub>2</sub> verantwortlich [169]. Daß in der Lunge TXA<sub>2</sub> gebildet werden kann, beschrieben GRYGLEWSKI ET AL [75] bereits 1978. In den folgenden Jahren konnte gezeigt werden, daß Endothelzellen in der Lage sind, infolge von Bradykinin-Stimulationen Thromboxan A<sub>2</sub> freizusetzen [8, 41, 127].

Allerdings sind auch Anstiege des pulmonalen Gefäßwiderstandes nach einem Bradykinin-Bolus beschrieben worden, bei denen *kein* Anstieg des Thromboxan A<sub>2</sub> nachgewiesen werden konnte [25], sowie *Potenzierungen* von pulmonalarteriellen Druckreaktionen nach Cyclooxygenasehemmung [139]

Zusammenfassend scheint sich allerdings – trotz teilweise sehr kontroverser Ergebnisse – abzuzeichnen, daß sowohl die Freisetzung von NO als auch die Aktivierung des Arachidonsäuresystems an der Vermittlung von Bradykinin-induzierten vasoaktiven Effekten in der pulmonalen Strombahn zu jeweils unterschiedlichen Anteilen beteiligt sind.

Auf die angesprochenen komplexen physiologischen Zusammenhänge und die kontroversen Resultate soll im Rahmen der Diskussion – unter Einbeziehung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit – ausführlich eingegangen werden.

## 1.7 KLINISCHE INTERAKTIONEN

Die seit ca. einem Jahrzehnt zunehmend häufigere und insbesondere *breitere* Anwendung von primär für die antihypertensive Therapie vorgesehenen **Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)- Hemmstoffen** hat – aufgrund des deutlich verlangsamten Kinin-Metabolismus – das Interesse an den Kininen und ihren Effekten in den Blutgefäßen stark wachsen lassen. Nicht zuletzt durch die Ergebnisse zahlreicher experimenteller Arbeiten ergaben sich erst die heute so vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der ACE-Hemmer.

Wie zahlreiche in der neueren Literatur veröffentlichte Arbeiten übereinstimmend beschreiben, trägt der induzierte „Kininanstau“ sowohl maßgeblich zur *Wirkung*, aber zugleich auch zu den *unerwünschten Effekten* der weit verbreiteten Therapie-

tika bei, wie auch am menschlichen Organismus demonstriert werden konnte [22, 64, 69, 72, 73, 83].

ACE-Hemmer können die Wirkung von Kininen – sowohl exogenen als auch endogenen – nach BÖNNER ET AL [22] um ca. das 50-fache steigern und auch die Wirkdauer erheblich verlängern.

Nach den Ergebnissen von NOLLY ET AL [138] exprimiert das Gewebe der Gefäßwände, wahrscheinlich im Sinne einer Autoregulation, selbst Gene für die Produktion von ACE. Das Angiotensin-Converting-Enzym (=Kininase II) ist an der Oberfläche der Endothelzellen lokalisiert. Darüber hinaus sind in diesen Gewebeschichten auch die genetischen Informationen für alle notwendigen Komponenten zur Produktion und Ausschüttung von Kininen – und damit ein lokales Kallikrein-Kinin-System – vorhanden [69, 138].

Somit kann durch Gabe eines ACE-Hemmers zum einen die Wirkung von endogenem, in der Gefäßwand produzierten Bradykinin potenziert werden. Zum anderen wird die Abbaukapazität für zirkulierendes Bradykinin reduziert und damit eine **lokale** Kinin-Akkumulation bzw. Wirkungsverstärkung erreicht (Abb. 1.6 b). Diese Mechanismen sollen im Rahmen der Diskussion ebenfalls noch näher erläutert werden.

Für das Herz wurde der Einfluß einer ACE-Hemmung bereits eingehend untersucht. Eine protektive Wirkung – die zum einen auf die Bradykinin-Potenzierung direkt, insbesondere aber auf die Ausschüttung der Autakoide NO und PGI<sub>2</sub> zurückzuführen ist [191] – gilt als gesichert und hat sich in der Arzneimitteltherapie etabliert. Vornehmlich sei an dieser Stelle auf den positiven Einfluß einer ACE-Blockade auf die Myocard-Ischämie bzw. den -Infarkt, die linksventrikuläre Hypertrophie oder auch auf den Nutzen bei Reperfusions-Arrhythmien verwiesen [23, 69, 167, 168].



Wie bereits im letzten Abschnitt erläutert, sind **Effekt und Wirkungsprinzip von hohen lokalen Bradykinin-Konzentrationen in der pulmonalen Gefäßstrombahn** nicht ausreichend bekannt. Mit der vorliegenden Arbeit soll zur weiteren Aufklärung der pathophysiologischen Hintergründe beigetragen werden.

Eine für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit wichtige Interaktion besteht neben der Kumulation von Kininen unter ACE-Hemmung auch zwischen dem Kininogen-Kallikrein-Kinin-System und **septischen Prozessen**.

Im septischen Schock kommt es, induziert durch Lipopolysaccharide (Endotoxin), über das Lipid A zur Freisetzung von endogen aktiven Substanzen wie Zytokinen, Arachidonsäuremetaboliten, Gerinnungsfaktoren, NO sowie des PAF (platelet-activating-factor). Darüberhinaus beschrieben z.B. MILLER AND MARGOLIUS 1997 [204], daß es im Rahmen der Sepsis auch zu einer Aktivierung des Kininogen-Kallikrein-Kinin-Systems mit einer daraus resultierenden erheblichen Kinin-Freisetzung kommt. Die Kinine sind entsprechend der in Tab. 1.1 dargestellten Effekte in der Lage, eine gesteigerte Gefäßpermeabilität hervorzurufen, außerdem erfolgt die Produktion toxischer O<sub>2</sub>-Metaboliten, die Bildung von Mikrothromben, sowie NO- bzw. Arachidonsäure-Metaboliten-vermittelt ein systemischer Blutdruckabfall. Kinine nehmen somit eine wesentliche Funktion bei septischen Prozessen bis hin zum septischen Organversagen ein.

Von wichtiger Bedeutung bei der Sepsis sind nach neueren Erkenntnissen auch die über Jahre als inaktiv (mit Ausnahme von des-arg<sup>9</sup>-Bradykinin bzw. des-arg<sup>9</sup>-Kallidin) eingestuften Abbaufragmente des Kallidins und Bradykinins.

Erwähnenswert ist hier insbesondere das stabile Pentapeptid RPPGF (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe), das nach den Ergebnissen von MORINELLI ET AL eine *protektive* Funktion

gegenüber dem zerstörerischen Effekt des Lipopolysaccharids als Sepsis-induzierender Metabolit ausübt [205].

Zusammenfassend spielen Bradykinin bzw. dessen Abbauprodukte gerade in der Frühphase des endotoxischen Schocks eine zentrale Rolle. Unter der Vorstellung, die septischen Ablaufprozesse beeinflussen zu können, sind seit Jahren Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten in (klinisch-)experimenteller Erforschung. Einige Arbeitsgruppen konnten einen positiven Einfluß von Rezeptor-Antagonisten im septischen Geschehen nachweisen, wie in den Übersichtsarbeiten von HIRAYAMA ET AL [206] und HEITSCH [20] gerade hinsichtlich einer verbesserten Überlebensrate bzw. verbesserter hämodynamischer Parameter dargestellt wird oder auch von YEKEBAS ET AL [208] für den septischen Kreislaufkollaps bei schwerer Pankreatitis beschrieben wird. Dennoch haben Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten bis heute noch keinen Einzug in die klinische Therapie gehalten, da die positiven Effekte insgesamt weniger überzeugend ausfielen als erwartet. Ggf. könnten hier die z. Zt. teilweise noch als „Prototypen“ vorliegenden sog. 3<sup>rd</sup>-generation-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten einen weiteren Durchbruch erzielen [207].

Bisher wurden in klinisch-experimentellen Versuchen lediglich B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten getestet, eine für klinische Untersuchungen suffiziente B<sub>1</sub>-spezifische Rezeptorblockade muß noch entwickelt werden.

In Hinblick auf die Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist auch die Rolle der Sepsis-modulierenden Cyclooxygenase-Produkte von Bedeutung. So konnten FISCHER ET AL an der isolierten, septischen Rattenlunge einen vasoprotektiven Effekt durch Cyclooxygenase-Inhibition bei Bradykinin-induzierter Gefäßkonstriktion aufzeigen [63].

## 1.8 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG

Am isolierten und perfundierten Lungenmodell des Kaninchens wurden die Auswirkungen von Bradykinin-Stimulationen auf den pulmonalarteriellen Druck unter spezieller Berücksichtigung der Freisetzung von NO, PGI<sub>2</sub> und TXA<sub>2</sub> untersucht. Die Versuchsreihen sollten insbesondere Aufschluß darüber geben, welche genaue Rolle die aus der koronaren und peripheren Zirkulation bekannten Bradykinin-Autakoide in der pulmonalen Gefäßstrombahn spielen.

Zu diesem Zweck wurden der NO-Synthasehemmer L-NAME sowie der Cyclooxygenasehemmer Diclofenac in den Perfusatkreislauf appliziert. Nach Auswertung der durch die Hemmung der jeweiligen Mediatoren induzierten Effekte sollten Rückschlüsse auf die Funktionen der verschiedenen Substanzen und deren Interaktionen in der Lungenstrombahn des Kaninchens gezogen werden.

Genauere Aussagen über die Arachidonsäuremetaboliten waren durch Bestimmung der stabilen Abbauprodukte des PGI<sub>2</sub> und TXA<sub>2</sub> (6-keto-PGF<sub>1α</sub> bzw. TXB<sub>2</sub>) im Perfusat mit Hilfe eines Enzymimmunoassays möglich.

Um die pulmonalarteriellen Druckwirkungen des Bradykinins beurteilen zu können, wurde für die Perfusion der Lungenstrombahn ein konstanter Perfusionsflow gewählt. Aufgrund physikalischer Gesetzmäßigkeiten spiegelte so der in den vorliegenden Versuchsreihen kontinuierlich aufgezeichnete Perfusionsdruck direkt den pulmonalarteriellen Gefäßwiderstand wider.

Zur Vermeidung möglicher Interaktionen von Blut- mit Endothelzellen bzw. der Ausschüttung von Arachidonsäuremetaboliten aus zellulären Blutbestandteilen kam in den Versuchsreihen eine zell- und blutfreie, physiologische Perfusatlösung zum Einsatz.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 ORGANENTNAHME

Als Organspender für die isolierten Lungen dienten männliche und weibliche Bastard-Kaninchen, die von den Behring-Werken in Marburg bezogen wurden. Die Tiere hatten ein Körpergewicht zwischen 2,3 kg und 2,6 kg.

Ziel des Präparationsvorgangs war eine möglichst schnelle und insbesondere atraumatische Präparation der Lunge aus der Thoraxhöhle der Kaninchens, um optimale Voraussetzung für stabile Versuchsverhältnisse zu schaffen.

Die Kaninchen wurden nach Legen eines periphervenösen Zugangs mit 20-30 mg/kg Körpergewicht Pentobarbitalnatrium (Nembutal®, CEVA GmbH, Bad Segeberg) zunächst leicht narkotisiert, um streßbedingte Reaktionen v.a. im kardiopulmonalen Kreislauf möglichst zu minimieren, danach wurde eine Antikoagulation zur Thromboembolieprophylaxe mit 1000 I.U./kg KG Heparin (Liquemin®, Hoffmann-LaRoche AG) durchgeführt.

Nach lokaler s.c.-Anästhesie mit Lidocain (Xylocain®, Astra Chemicals GmbH, Wedel) kaudal des Larynxbereiches wurde die Trachea freipräpariert und nach Durchführung einer kleinen Inzision eine Kunststoff-Trachealkanüle ( $\Phi = 3,5$  mm) in die Luftröhre eingeführt und fixiert. Ab diesem Zeitpunkt erfolgte eine kontrollierte Beatmung der Kaninchenlunge.

Es schloß sich eine Narkosevertiefung mittels 35-50 mg/kg KG Nembutal® an. Nachdem das Tier keine Reaktionen auf Schmerzreize mehr zeigte, wurde nach Abpräparation von Fell-, Haut- und Muskelschichten die Abdominalhöhle kaudal des Processus xiphoideus eröffnet und das Diaphragma beidseits vom Rippenbogen abgelöst. Nun folgte eine vom oberen Abdomen ausgehende mediane Sternotomie unter Schonung der in der Thoraxhöhle gelegenen Organe. Durch Auseinanderziehen

und seitliche Fixierung beider Thoraxwandhälften (einschließlich der Pleura) unter leichtem Zug mit Hilfe von Fixierungsbändern am Präparationstisch konnte nach Abpräparation des Thymus die gesamte Trachea in der eröffneten Thoraxhöhle dargestellt werden.

Ziel des sich anschließenden Präparationsschrittes war jetzt die Darstellung der Arteria pulmonalis, insbesondere ihres Abgangs aus dem rechten Ventrikel.

Um diesen Bereich freizulegen und für die Katheterisierung vorzubereiten, erfolgte eine Eröffnung und Teilresektion des Perikards. Anschließend wurde ca. 1 cm hinter dem Ventrikelabgang der Pulmonalarterie eine lockere Ligatur um das Gefäß gelegt. Nach Schnittinzision der A. pulmonalis konnte dann ein Kunststoff-Perfusionskatheter ( $\Phi = 4 \text{ mm}$ ) in das Gefäß eingeführt und durch Zuziehen der Ligatur fest fixiert werden. In dem mit Perfusatlösung blasenfrei gefüllten Perfusionsschlauch war ein mit physiologischer NaCl-Lösung gefüllter Innenkatheter zur konstanten Druckmessung integriert. Während der Kanülierung der A. pulmonalis wurde streng darauf geachtet, daß es zu keiner Luftembolie in die Pulmonalarterie kam. Bis zur vollständigen Lungenentnahme aus der Thoraxhöhle wurde ein geringer Perfusionsflow von ca. 20 ml/min aufrecht erhalten.

Nach vorsichtiger Ablösung des Mediastinalgewebes von der Lunge wurde das Organ zusammen mit dem Herz aus der Thoraxhöhle entnommen und zur weiteren Bearbeitung am Perfusions- und Beatmungskatheter freihängend fixiert.

Ein ungehinderter Abfluß des Perfusats aus den Lungenvenen wurde durch die Resektion des Herzes gewährleistet. Um vereinzelte Blutauflagerungen abzuwaschen und dadurch möglichen Ödembildungen vorzubeugen, wurde die Lungenoberfläche mit einer 0,9%igen NaCl-Lösung vorsichtig abgespült.

Zuletzt erfolgte eine Befestigung des Lungenpräparates an dem Haken einer Wägezelle (Hottinger-Baldwin Meßtechnik, Gießen), so daß beide Lungenflügel in einem doppelwandigen Glasbehälter frei zum Hängen kamen. Der Glasbehälter wurde mit einem Kunststoffdeckel verschlossen. Anschließend wurde mit der Flowsteigerung begonnen.

Mittels der Aufhängung an der elektronischen Wägeeinheit konnten sowohl das Ausgangsgewicht als auch evtl. Gewichtsänderungen der Lunge im Versuchsverlauf kontinuierlich registriert werden.

Die gesamte Präparation dauerte ca. 20-25 Minuten, die Unterbrechung des Kreislaufes vom Zeitpunkt der Katheterisierung der A. pulmonalis bis zur Aufnahme der Flowsteigerung nahm ca. 5 - 7 Minuten in Anspruch.

## **2.2 PERFUSION DER ISOLIERTEN LUNGE**

### **2.2.1 PERFUSIONSSYSTEM**

Ausgangspunkt des Perfusatkreislaufs des bei den Versuchen verwendeten sog. „halboffenen Systems“ waren drei doppelwandige Glaskolben mit einem Fassungsvermögen von jeweils 300 ml. Zwei der Kolben dienten als Perfusatreservoir für die ständigen Spülvorgänge des Lungenpräparates in der Zeit der Flowsteigerung zu Beginn des Versuchs, während der dritte Kolben dauerhaft zum System hin auf Durchfluß eingestellt war. Den Perfusatkolben nachgeschaltet war eine Rollerpumpe (Masterflex; Cole Parmer Instruments Co; Chicago, USA), die das Perfusat durch einen Mikrofilter (SQ 40 S; Pall Biomedical Inc, Fajardo, USA) und eine Blasenfalle in den Pulmonalarterienkatheter und damit in die Lungenstrombahn beförderte. Nach dem Lungendurchfluß und dem Austritt aus den Lungenvenen floß das Perfusat wieder über eine kurze Schlauchverbindung in den zum System hin geöffneten Kolben

zurück. Das gesamte Perfusionsschlauchsystem war durch zahlreiche Entlüftungstopfen sowie die bereits oben erwähnte Blasenfalle vor unerwünschten Luftembolien geschützt.

Durch eine Schlauchweiche wurden kleine Mengen an Perfusat zur konstanten pH- und Temperaturkontrolle (Microprozessor „wtw“, Weilheim) mit Hilfe einer zweiten Pumpe (Ismatec SA, Glattdbrugg, Zürich) durch einen parallel zum Hauptsystem geschalteten kleinen Kreislauf gepumpt.

Um möglichst physiologische Bedingungen zu simulieren, wurden sowohl die doppelwandigen Perfusatkolben als auch der Glasbehälter mit der freihängenden Kaninchenlunge mit Hilfe eines externen, thermostatgesteuerten Wärmesystems (Thermomix UB, Fa. Braun, Melsungen) von konstant 37° C warmem Wasser durchströmt.

### 2.2.2 PERFUSIONSLÖSUNG

Die Kaninchenlunge wurde mit einer Krebs-Henseleit-HAES<sub>6,5%</sub>-Pufferlösung perfundiert. Das Perfusat setzte sich aus vier Stammlösungen zusammen.

Der pH-Wert des verwendeten Mediums lag zwischen 7,3 und 7,4. Das Perfusat wurde mittels Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) auf diesen Zielwert eingestellt. Der pH-Wert wurde bei Bedarf im Verlauf der Versuchsreihen über eine Modulation der CO<sub>2</sub>-Konzentration im Atemgas nachgeregelt und damit in dem genannten Bereich gehalten.

Nachfolgend wird ein Überblick über die genaue Zusammensetzung des Perfusats, bezogen auf 1000 ml gegeben (Tab 2.1, 2.2 und 2.3).

**Zusammensetzung für 1000 ml Pufferlösung:**

STAMMLÖSUNGEN	VOLUMEN
HAES 10 %	650 ml
Glukose 10 %	25 ml
NaHCO <sub>3</sub>	125 ml
<b>Elektrolytlösung A</b>	200 ml

**Tab. 2.1**

Die **Elektrolytlösung A** setzt sich wie folgt zusammen (ad 1000 ml Aqua dest)

ELEKTROLYTLÖSUNG A	MENGE (g/l)
NaCl	7,156 g/l
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1,750 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,750 g/l
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1,350 g/l
KCl	1,262 g/l

**Tab. 2.2**

Hieraus ergeben sich für die Krebs-Henseleit-HAES<sub>6,5%</sub>-Perfusionslösung folgende (errechnete) Elektrolyt-Endkonzentrationen (mmol/l) (Tab 2.3):

ELEKTROLYTE	ENDKONZENTRATION
Ca <sup>2+</sup>	2,38 mmol/l
K <sup>+</sup>	4,50 mmol/l
Mg <sup>2+</sup>	1,33 mmol/l
PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,10 mmol/l
Na <sup>+</sup>	138,00 mmol/l
Cl <sup>-</sup>	110,80 mmol/l

**Tab. 2.3**



### 2.2.3 PERFUSIONSMODUS

Um nach der Lungenpräparation ein Auswaschen von Blutzellen und anderen Blutbestandteilen aus der pulmonalen Strombahn zu erreichen und diese dem Perfusatkreislauf zu entziehen, erfolgten nach Beendigung der Präparation und Fixierung des Präparates an der Wägezelle bei niedrigem Perfusionsflow mehrere Spülvorgänge. Dem Perfusionskreislauf wurde unter ständiger pH-, pO<sub>2</sub>- bzw. pCO<sub>2</sub>-Kontrolle (ABL2-330, Radiometer GmbH, Willich) frische Krebs-Henseleit-HAES<sub>6,5%</sub>-Perfusatlösung zugeführt, das die Lunge durchspülende und schließlich wieder zurückfließende Perfusat verworfen.

Gleichzeitig mit den Spülvorgängen wurde der Perfusionsflow gesteigert. In Abständen von fünf Minuten erfolgte eine langsame Flowerhöhung um jeweils 40 ml/min bis zu einem End- bzw. Zielperfusionsflow von 200 ml/min, der dann für die Versuchsdauer konstant beibehalten wurde. Die gesamte Flowsteigerung nahm somit ca. 20 Minuten in Anspruch.

Das gesamte Perfusionssystem war sowohl im Rahmen der Spülvorgänge als auch zur Durchführung der Versuchsreihen mit einem Volumen von 200 ml gefüllt.

Es schloß sich nun eine 20-minütige „steady state“-Phase an. In dieser Zeit wurden v.a. mehrfache pH-Wert-Kontrollen des Perfusats durchgeführt und diesbezüglich eine evtl. notwendige Regulation des CO<sub>2</sub>-Gehalts in der Beatmungsluft vorgenommen. Weiterhin unterlagen der pulmonalarterielle Druck sowie das Lungengewicht ständiger Kontrolle.

Nur bei konstant bleibenden Werten und damit stabilen Verhältnissen im isolierten Lungenpräparat wurde nach 20 Minuten mit den Versuchsreihen begonnen.

### 2.3 VENTILATIONSSYSTEM

Die Kaninchenlunge wurde mit einer Frequenz von 40/min und einem Hubvolumen von 20ml/Atemzug beatmet (Beatmungspumpe Fa. B. Braun, Melsungen). Somit ergab sich ein Atemminutenvolumen (AMV) von 800ml. Die Beatmung der Kaninchenlunge war während des gesamten Präparationsvorgangs zu keinem Zeitpunkt unterbrochen. Nach Abschluß der Präparation war in den meisten Fällen ein 2- bis 3-maliges Blähen (d.h. kurzzeitiger Verschluß des Expirationsschlauchs für die Dauer von 2 bis 3 Beatmungszyklen) der Lunge notwendig, um Atelektasen wieder zu durchlüften und dadurch einer möglichen Ödementwicklung vorzubeugen. Aus dem gleichen Grund wurde nach Beendigung der Präparation ein positiv endexpiratorischer Druck (PEEP) von ca. 1,5-2 cm H<sub>2</sub>O eingestellt.

Initial wurde die Lunge zur Sauerstoffaufsättigung mit 5 l O<sub>2</sub>/min beatmet, kurz vor Katheterisierung der A. pulmonalis wurde die O<sub>2</sub>-Zufuhr auf den Raumluftgehalt (21% O<sub>2</sub>) reduziert. Außerdem erfolgte zum gleichen Zeitpunkt eine Steigerung der CO<sub>2</sub>-Zufuhr in der Beatmungsluft, um einen pH-Wert des Perfusats zwischen 7,3 und 7,4 einzustellen.

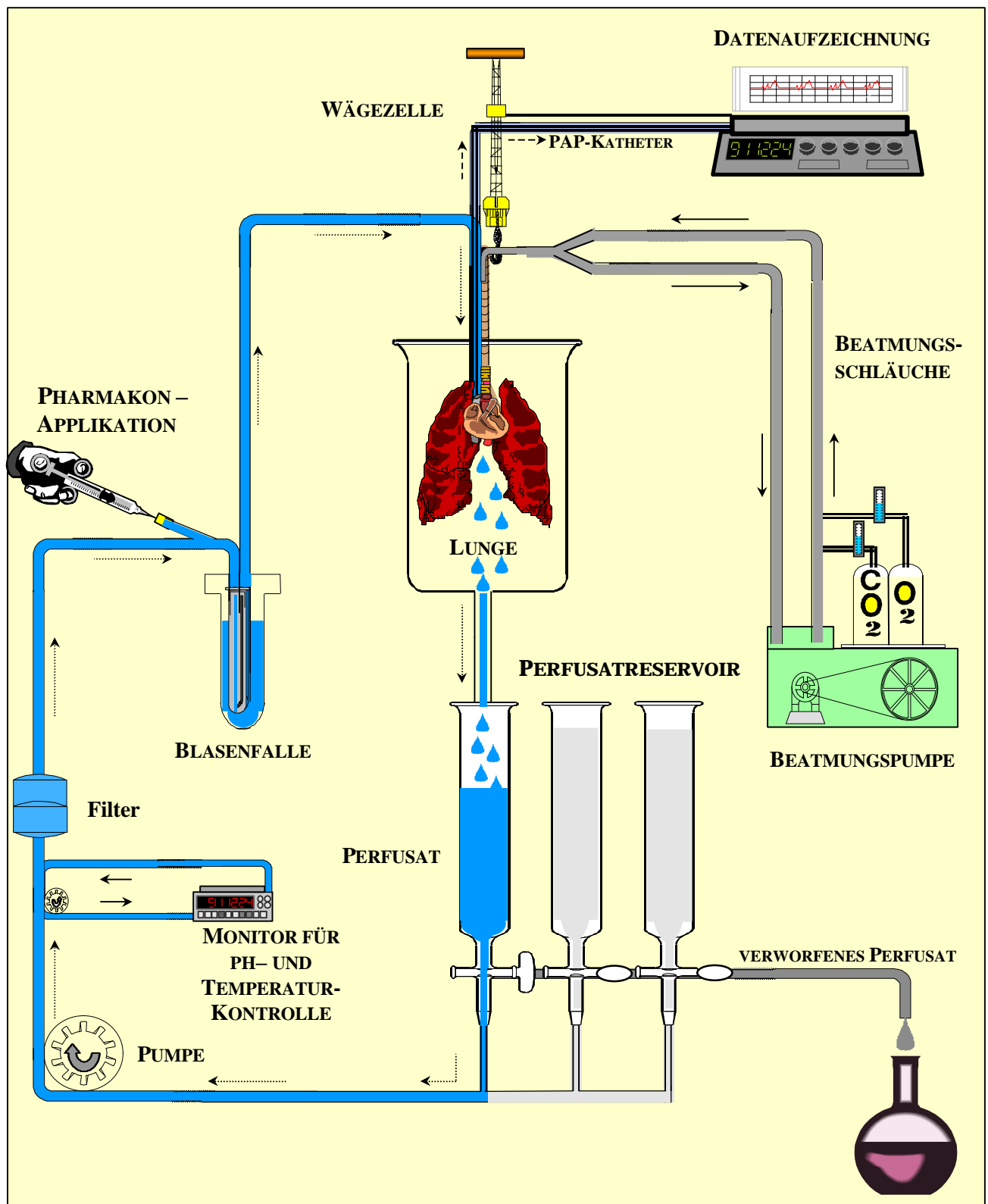
### 2.4 MESSUNG DES PULMONALARTERIELLEN DRUCKS (PAP)

Die Messung des pulmonalarteriellen Drucks (PAP) erfolgte mittels eines mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllten Innenkatheters ( $\Phi = 0,5$  mm), der über ein T-Stück in den zur Lungenarterie führenden Schenkel des Perfusionsschlauchs bis zur Spitze des Pulmonalkatheters geleitet wurde. Somit konnten die Druckänderungen in den arteriellen Lungengefäßen unter Verwendung eines an den Innenkatheter angeschlossenen, ebenfalls mit 0,9%iger NaCl-Lösung gefüllten

Druckaufnehmers (Combitrans®-Monitoring-Set; B. Braun, Melsungen) kontinuierlich erfaßt werden.

Alle gewonnenen Daten (pulmonalarterieller Druck, Lungengewicht und pH-Wert) wurden mit Hilfe eines analogen Kompensationslinienschreiber (Rikadenki 'R-10 Series', Kogyo Co Ltd., Tokyo, Japan) konstant aufgezeichnet.

Einen zusammenfassenden Überblick über den Versuchsaufbau gibt die Abb. 2.1.



**Abb 2.1** Schematische Darstellung des Systems zur Perfusion und Beatmung der isolierten Lunge.

## 2.5 PROBENENTNAHME

Vor jeder Pharmakonapplikation in den Perfusatkreislauf wurden zur Bestimmung der stabilen Abbauprodukte der Arachidonsäuremetaboliten  $\text{TXA}_2$  und  $\text{PGI}_2$  ( $\text{TXB}_2$  und 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ ) Perfusatproben von jeweils 4 ml aus dem Kreislauf aspiriert. Somit konnten bei der Auswertung und Interpretation der Daten direkt Rückschlüsse bezüglich der durch die jeweiligen Substanzen induzierten Effekte auf das Arachidonsäuresystem gezogen werden.

Um ein absolut zellfreies Perfusatmedium zu erhalten, wurden die Proben bei 3000 U/min über 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  abzentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde in Eppendorf-Hütchen à 1 ml gefüllt und bis zur laborchemischen Auswertung bei  $-25^\circ\text{C}$  tiefgefroren.

## 2.6 HERSTELLUNG DER STAMMLÖSUNGEN DER VERWENDETEN PHARMAKA

- **Bradykinin (BK)**

Bradykinin ([Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg]-Acetat-Salz,  $\text{C}_{50}\text{H}_{73}\text{N}_{15}\text{O}_{11}$ , Fa. Sigma-Aldrich/Deisenhofen, MW: 1060, Produkt-Nr.: B3259), wurde in den Hauptversuchsreihen der vorliegenden Arbeit in einer Enddosierung von  $10^{-6}$  mol/l eingesetzt. Außerdem fanden im Rahmen von Vorversuchen, zwecks Prüfung der für die späteren Versuchsreihen am besten geeigneten BK-Dosierung, verschiedene Verdünnungen Anwendung, jeweils ausgehend von einer Stammlösung mit einer Konzentration von  $10^{-3}$  mol/l.

Die Stammlösung wurde hergestellt, indem 1,06 mg Bradykinin in 1 ml NaCl gelöst wurden. Verdünnte man nun 1 ml der Lösung mit 4 ml Ringer-Lösung®, ergab sich bei Applikation von 1 ml dieser BK-Verdünnung ( $2 \cdot 10^{-4}$  mol/l) in 200 ml Perfusat eine Endkonzentration von  $10^{-6}$  mol/l.

- **N<sub>ω</sub>-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME)**

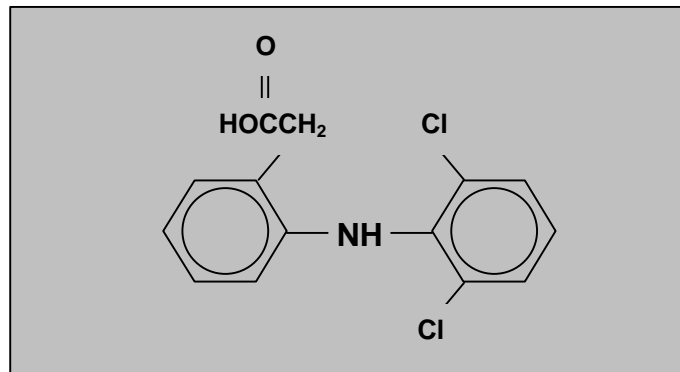
Der NO-Synthasehemmer N<sub>ω</sub>-Nitro-L-Arginin-Methylester (Abb. 1.5) wurde als Hydrochlorid von der Fa. Sigma-Aldrich / Deisenhofen (C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub> · HCl, MW: 269,7; Produkt-Nr.: N5751) bezogen. Das Lösen von 26,97 mg des L-NAME in 1 ml Aqua dest. ergab eine Stammlösung vom  $10^{-1}$  mol/l. Nach Durchführung entsprechender Verdünnungsreihen wurden in den Vorversuchen Dosierungen von  $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l bis  $2 \cdot 10^{-6}$  mol/l getestet, Anwendung fand in den Versuchsreihen letztlich eine L-NAME-Dosierung von  $2 \cdot 10^{-5}$  mol/l, hieraus ergibt sich eine Endkonzentration im Perfusatkreislauf von  $10^{-7}$  mol/l.

- **Diclofenac**

Diclofenac (Abb. 2.2) gehört zu den nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAP), einer Gruppe chemisch heterogener Verbindungen. Die Substanz ist den Heteroarylsäuren zuzuordnen. Die NSAP hemmen die Cyclooxygenase und damit die Synthese von PGG<sub>2</sub> und allen Folgesubstanzen. Allerdings inhibieren diese Stoffe nicht den Metabolismus von Arachidonsäure durch Lipoxxygenasen.

Die Hemmung der Cyclooxygenase erfolgt kompetitiv, eine Ausnahme hiervon stellt nur die Acetylsalicylsäure dar, die über eine kovalente Bindung sowohl an COX-1 und COX-2 zu einer irreversiblen Blockierung der Cyclooxygenase führt. Die meisten der in der therapeutischen Anwendung befindlichen NSAP hemmen die COX -1 und

COX-2 nicht selektiv, eine tendenziell aber etwas stärkere Hemmung der COX-1 wurde beschrieben [110].



**Abb. 2.2** Chemische Struktur von Diclofenac.

Diclofenac verfügt über eine analgetische, antipyretische und antiphlogistische Wirkung. Es hemmt die Cyclooxygenase unselektiv und seine Potenz wird höher bewertet, als die des in vielen experimentellen Arbeiten eingesetzten Indomethacins [110]. Die Substanz ist fast vollständig (99%) an Plasmaproteine gebunden und besitzt eine Halbwertszeit  $T_{1/2}$  von ein bis zwei Stunden. Abgebaut wird Diclofenac durch ein Cytochrom-P450-Enzym in der Leber. Die Ausscheidung erfolgt überwiegend renal (65%) und weniger biliär (35%) [64, 73].

In den Versuchsreihen wurde Diclofenac-Natrium (Voltaren®, Fa. Ciba-Geigy GmbH, Wehr; [1 Amp. à 3 ml mit 75mg Diclofenac-Natrium]) verwendet.

Zur Herstellung der Stammlösung wurde eine Ampulle des Medikaments (= 75 mg) in 75 ml physiologische Kochsalzlösung gespritzt. Hieraus ergab sich eine Konzentration von 1mg Diclofenac/ml Stammlösung. Als Bolus wurden 2 ml (= 2 mg) der Stammlösung in den Perfusionskreislauf appliziert. Es ergab sich so eine Diclofenac-Endkonzentration von 10 µg/ml in der zirkulierenden Perfusatlösung.

Die Dosierung richtete sich – bei einem mittlere Körpergewicht (KG) der Kaninchen von 2,5 kg – gewichtsbezogen nach der empfohlenen niedrigen bis mittleren Einzeldosis des Cyclooxygenasehemmers bei einem Erwachsenen (75 kg KG).

Tab. 2.4 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die in den Versuchsreihen verwendeten Pharmaka-Dosierungen.

PHARMAKON	ENDKONZENTRATION
Bradykinin	$10^{-6}$ mol / l
N <sup>ω</sup> -Nitro-L-Arginine-Methylester (L-Name)	$10^{-7}$ mol / l
Diclofenac	10 µg / ml

**Tab. 2.4** Endkonzentration der verwendeten Substanzen im Perfusatkreislauf (bezogen auf 200ml Perfusatvolumen)



### 2.7 BESTIMMUNG DER STABILEN METABOLITEN TXB<sub>2</sub> UND 6-KETO-PGF<sub>1α</sub>

Die gewonnenen Perfusatproben wurden nach Abschluß aller Versuchsreihen laborchemisch hinsichtlich der stabilen Abbauprodukte von Thromboxan A<sub>2</sub> und Prostazyklin ausgewertet. Hierzu wurden die stabilen Metaboliten Thromboxan B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) bzw. 6-keto-PGF<sub>1α</sub> bestimmt.

Für beide genannten Substanzen wurden ELISA-Testkits der Fa. Cayman (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI 48108 USA) verwendet:

- ◆ 6-KETO-PGF<sub>1α</sub>: Enzyme Immunoassay Kit; Cat# 515211; 96 wells.
- ◆ Thromboxan B<sub>2</sub>: Enzyme Immunoassay Kit; Cat# 519031; 96 wells.

Nachfolgend soll der auf dem Grundprinzip einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruhende ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) am Beispiel des TXB<sub>2</sub> kurz erläutert werden.

Im Rahmen einer kompetitiven Hemmung konkurrieren freies – in den zu untersuchenden Perfusatproben enthaltenes – TXB<sub>2</sub> und ein Tracer-TXB<sub>2</sub> um eine beschränkte Anzahl TXB<sub>2</sub>-spezifischer Kaninchen-Antiserum-Bindungsstellen. Die Konzentration des Tracers, ein Acetylcholinesterase-Molekül gekoppelt an TXB<sub>2</sub>, ist konstant und bekannt, während die Konzentration des freien TXB<sub>2</sub> variiert. Die Menge des Tracer-TXB<sub>2</sub>, die an die Antiserum-Rezeptoren andockt, ist umgekehrt proportional zu der freien Menge an TXB<sub>2</sub>. Der TXB<sub>2</sub>-Antiserum-Komplex bindet sich nun an die in dem Kit vorhandenen monoklonalen-Kaninchen-Antikörper. Im Rahmen von Waschvorgängen werden ungebundene Reagenzien aus dem Kit entfernt, dann wird ein spezifisches (sog. Ellman's) Reagenz hinzugegeben. Hierin ist zum einen ein Substrat für die Acetylcholinesterase, das Acetylthiocholin, zum ande-

ren 5,5'-dithio-bis-(2-Nitrobenzol-Säure) enthalten. Das Acetylthiocholin wird von der Acetylcholinesterase enzymatisch zu Thiocholin abgebaut.

Als Ergebnis der enzymatischen Reaktion ergibt sich eine gelbliche Verfärbung des Kits, dessen Intensität im Photospektrometer bei 412 nm gemessen wird. Hier liegt eine starke Absorption von 5-thio-2-Nitrobenzolsäure vor, die aus einer nicht-enzymatischen Reaktion aus Thiocholin mit 5,5'-dithio-bis-(2-Nitrobenzol-Säure) entsteht. Die Intensität der Absorption ist proportional der gebundenen Menge an Tracer-TXB<sub>2</sub>. Aufgrund der umgekehrten Proportionalität können dann quantitative Rückschlüsse über die in den untersuchten Perfusatproben vorhandenen TXB<sub>2</sub>-Mengen gezogen werden.

Identisch mit dem oben geschilderten Testablauf wird die quantitative Bestimmung des 6-keto-PGF<sub>1α</sub> durchgeführt. Lediglich Tracer und Antiserum werden 6-keto-PGF<sub>1α</sub>-spezifisch ausgetauscht.

Die Spezifität der Testkits für TXB<sub>2</sub> sowie 6-keto-PGF<sub>1α</sub> werden vom Hersteller mit 100% angegeben.

## 2.8 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung der Versuchsreihen wurde mit Hilfe des PC-Programms „STATGRAPHICS™“ (STSC Inc., USA) durchgeführt. Für alle Meßzeitpunkte wurden für die Parameter PAP, TXB<sub>2</sub> sowie PGI<sub>2</sub> jeweils die Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler (SE) berechnet.

Um statistisch signifikante Aussagen bezüglich der erhaltenen Daten machen zu können, wurden darüber hinaus Varianzanalysen und der t-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurden als signifikant, bei  $p < 0,01$  als hoch signifikant bewertet.

## 2.9 VORVERSUCHE

Mittels **Leerversuchen** ( $n = 6$ ) wurde das Modell der isolierten und perfundierten Kaninchenlunge zunächst auf Stabilität überprüft. Da der pulmonalarterielle Gefäßwiderstand die maßgebliche Beobachtungsgröße der sich anschließenden Versuchsreihen sein sollte, mußte zunächst ausgeschlossen werden, daß es zu *spontanen* Veränderungen des PAP im zeitlichen Verlauf kommen würde. Daher wurden die isolierten Lungen über einen Mindestzeitraum von 120 Minuten beobachtet und sowohl der PAP als auch das Gewicht konstant registriert. Nach Abschluß der „steady state“-Phase wurden keine Pharmaka in das Perfusatsystem appliziert.

Im Rahmen von **Dosisfindungsversuchen** sollten für Bradykinin und L-NAME die für die Hauptversuche geeigneten Dosierungen herausgefunden werden.

Für das **Bradykinin** wurde eine Dosierung gesucht, unter der eine vasoaktive Antwort in der Lungenstrombahn induzierbar war. Diese sollte gut reproduzierbar sein. Begonnen wurde mit einer BK-Endkonzentration von  $10^{-9}$  mol/l, es erfolgte eine Steigerung der Konzentrationen in 10er-Potenzen bis zu einer Dosierung von  $10^{-6}$  mol/l.

Die NO-Synthasehemmung mittels **L-NAME** wurde in absteigenden Dosierungen, beginnend mit einer Endkonzentration von  $10^{-4}$  mol/l, durchgeführt. Die niedrigste getestete Dosierung lag bei  $2 \cdot 10^{-6}$  mol/l, dies entspricht einer Endkonzentration im Perfusat von  $10^{-8}$  mol/l.

### 2.10 VERSUCHSREIHEN I – IV

Nach Durchführung der Vorversuche wurden vier Versuchsreihen gebildet. Um hinsichtlich der statistischen Auswertung signifikante Aussagen machen zu können, wurden die Versuchsreihen mit jeweils 6 Lungenpräparaten durchgeführt.

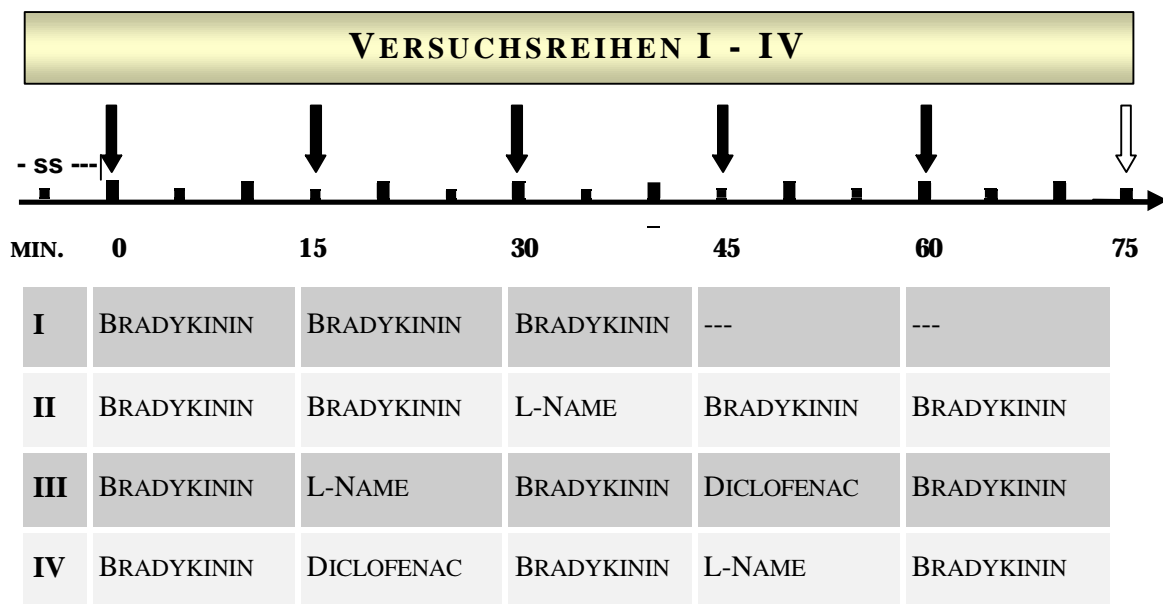
Die verwendeten Pharmaka wurden alle in Form einer *Bolus*-Applikation innerhalb einer halben Sekunde in den Perfusionskreislauf injiziert.

Die verschiedenen Versuchsreihen wurden nur durchgeführt, wenn die Organe innerhalb der „steady-state-Phase“ von 20 Minuten keine Veränderungen im pulmonal-arteriellen Druck aufwiesen. Alle Versuche wurden in der 75. Minute – nach Entnahme einer letzten Perfusatprobe – beendet.

Identisch in allen Versuchsreihen war die zeitgleiche Applikation des jeweiligen Pharmakons im Abstand von 15 Minuten (zum Zeitpunkt 0, 15., 30., 45. und 60. Minute). Vor jeder Injektion erfolgte die Entnahme einer Perfusatprobe zur späteren Bestimmung der stabilen Metaboliten.

Die Einzelversuche der verschiedenen Versuchsreihen wurden randomisiert durchgeführt.

Das nachfolgende Übersichtsschema (Abb. 2.3) faßt den Ablauf der durchgeführten Versuchsreihen zusammen.



**Abb. 2.3**      **Übersichtsschema der Versuchsreihen I – IV**

Die Tabelle zeigt das Schema nach dem die jeweiligen Substanzen in den Kreislauf appliziert wurden [n=6 je Versuchsreihe].

VOR der jeweiligen Pharmakongabe wurde eine Perfusatprobe entnommen, zuletzt in der 75. Minute. (ss = steady state).

**Bradykinin:**  $10^{-6}$  mol/l      **L-NAME:**  $10^{-7}$  mol/l      **Diclofenac:** 10 µg/ml

↓ = Perfusatprobe + Pharmakon      ↓↓ = nur Perfusatprobe

### • VERSUCHSREIHE I

Im Rahmen dieser Versuchsanordnung sollte mit der o.g. Dosierung die Wirkung von rezidivierenden Bradykinin-Bolus-Applikationen aufgezeigt werden.

Insbesondere war von Interesse, welche Änderungen des pulmonalarteriellen Gefäßwiderstands und damit dem pulmonalarteriellen Druck (PAP) auftraten.

Außerdem sollten Basisdaten für die drei folgenden Versuchsreihen bezüglich der Produktion der Arachidonsäuremetaboliten Prostazyklin und Thromboxan A<sub>2</sub> erhoben werden.

- **VERSUCHSREIHE II**

Nach zweimaliger Bradykinin-Stimulation wurde L-NAME als Bolus in den Kreislauf gespritzt, dann folgten in jeweils 15-minütigem Abstand erneut zwei Bradykinin-Stimulationen.

Ziel dieser Applikationsanordnung war, Aufschluß über die Rolle des bisher v.a. im systemischen und koronaren Kreislauf erforschten Kinin-Mediators NO im pulmonalen Stromkreis zu erhalten. Von Interesse war daher sowohl die direkte Reaktion des Gefäßtonus auf eine NO-Synthasehemmung als auch die Reaktion des Gefäßwiderstandes auf erneute Bradykinin-Gaben in Anwesenheit des L-NAME.

Außerdem standen die Veränderungen in der Synthese von  $\text{PGI}_2$  und  $\text{TXA}_2$  unter Beobachtung.

- **VERSUCHSREIHE III**

Hier erfolgte nach einmaliger Bradykinin-Stimulation ein L-NAME-Bolus in der 15. Minute, dann eine erneute Bradykinin-Gabe gefolgt von einer Diclofenac-Substitution, bevor in der 60. Minute erneut Bradykinin appliziert wurde.

Ziel dieser Versuchsanordnung war, zunächst mittels NO-Synthasehemmung die modulierende Wirkung des NO auszuschalten, um so ausschließlich den Einfluß der Cyclooxygenase-Produkte – respektive von  $\text{PGI}_2$  und  $\text{TXA}_2$  – auf den pulmonalen Gefäßwiderstand beobachten zu können. Diesem Zweck diente ergänzend auch die sich anschließende Cyclooxygenase-Hemmung. Bei der letzten Bradykinin-Stimulation war die Produktion aller Bradykinin-Autakoide gehemmt, insbesondere war daher jetzt die pulmonalarterielle Druckreaktion auf die erneute Peptid-Stimulation von Interesse.

- **VERSUCHSREIHE IV**

Im Vergleich mit der Versuchsreihe III wurde hier der Zeitpunkt der Diclofenac- mit der L-NAME-Applikation vertauscht bei ansonsten unverändertem Versuchsschema. Insbesondere sollte diese Versuchsanordnung Aufschluß darüber geben, inwiefern sich die NO-Synthase-Hemmung *nach* einer Cyclooxygenase-Hemmung bei erneuter Bradykinin-Bolusgabe auf den PAP auswirken würde.

Die frühe Gabe des Diclofenacs sollte zudem zeigen, in welcher Form die Prostaglandin-Metaboliten an der Vermittlung der Bradykinin-induzierten Druckreaktion bei *ungestörter* NO-Synthese beteiligt sind.

Mögliche Interaktionen zwischen dem NO und den Arachidonsäuremetaboliten waren durch die sich in ihrer Aussagekraft ergänzenden Resultate der Versuchsreihen III und IV aufzeigbar.

### 3 ERGEBNISSE

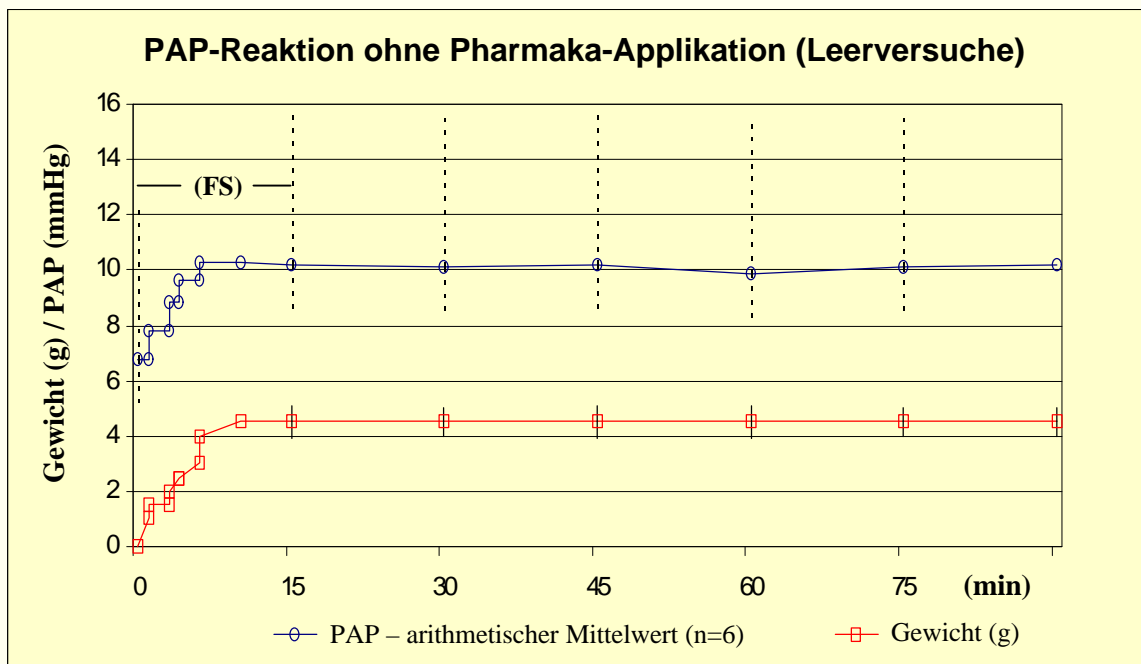
#### 3.1 VORVERSUCHE

Im Rahmen von Vorversuchsreihen sollte zunächst das System der isolierten und perfundierten Kaninchenlunge auf Stabilität überprüft werden. Außerdem war Ziel dieser Vorversuche, eine geeignete Dosierung der einzelnen Pharmaka für die folgenden Hauptversuche zu finden.

##### 3.1.1 LEERVERSUCHE

Eine Reihe (n=6) von Leerversuchen zeigte, daß die isolierte und perfundierte Kaninchenlunge unter Kontrolle von pH-Wert ( $7,39 \pm 0,04$  (SD)) bzw.  $pO_2$  und  $pCO_2$  über 120 Minuten stabil perfundierbar war. Drei Versuche wurden nach dieser Zeit abgebrochen, ohne daß es zu einem signifikanten Druckanstieg oder einem Gewichtsanstieg – im Rahmen von Ödemeinlagerungen – kam. Versuchsweise wurden drei der Lungenpräparate über diesen Zeitraum hinaus perfundiert und beatmet, hiervon zwei der Lungen über insgesamt 220 min. Auch hier zeigten sich keine pulmonalarteriellen Druckänderungen. Dies läßt den Rückschluß zu, daß sich der Versuchsaufbau eignet, Aussagen über pulmonalarterielle Druckreaktionen infolge von Pharmakagaben in den Perfusionskreislauf zuzulassen. Spontane, durch die Versuchsmethodik bedingte Änderungen des pulmonalarteriellen Drucks (PAP), konnten ausgeschlossen werden (Abb. 3.1).





**Abb. 3.1** Darstellung der Leerversuche [n=6] zur Überprüfung der Stabilität des verwendeten Versuchsmodells. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die Schwankungsbreite der absoluten PAP-Werte zwischen den einzelnen isolierten Lungen. Sowohl PAP als auch das Gewicht ändern sich im Verlauf nicht.  
(FS = Flowsteigerung)

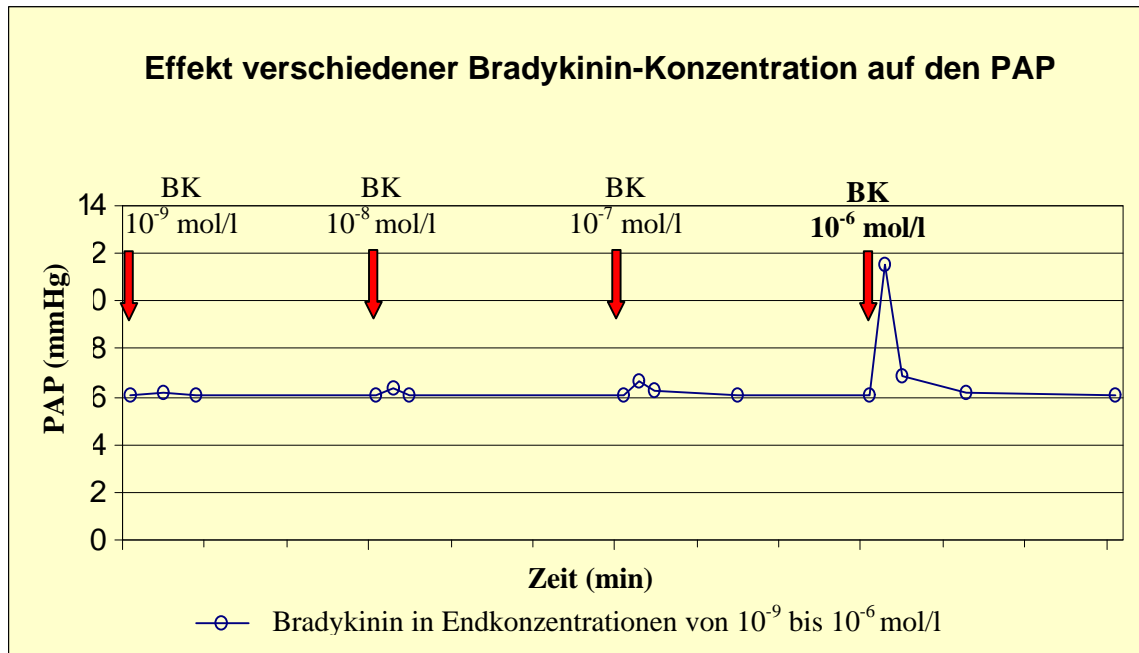
### 3.1.2 DOSISFINDUNGSVERSUCHE

#### 3.1.2.1 BRADYKININ (BK)

Ziel der Dosisfindung war, herauszufinden, ob bzw. in welcher Konzentration es nach einer Bradykinin-Bolusapplikation in die Lungenstrombahn zu einer Änderung des pulmonalarteriellen Drucks kommen würde.

Hierzu wurden die Bradykinin-Dosierungen in 10er Potenzen erhöht. Alle folgenden Dosisangaben sind auf die im Perfusatvolumen (200ml) vorliegenden Endkonzentrationen bezogen. Bei Bradykinin-Konzentrationen von  $10^{-9}$  mol/l bis  $10^{-7}$  mol/l kam es zu keinen signifikanten Änderungen des PAP. Endkonzentration von  $10^{-6}$  mol/l führten hingegen zu einem hochsignifikanten und gut reproduzierbaren PAP-An-

stieg. Die genannte Kinin-Konzentration wurde daher für die Versuchsreihen gewählt (Abb. 3.2).



**Abb. 3.2** Bei den ansteigenden Bradykinin-Konzentrationen kommt es erst bei 10<sup>-6</sup> mol/l zu einem signifikanten und gut reproduzierbaren PAP-Anstieg [n=6].

### 3.1.2.2 L-NAME

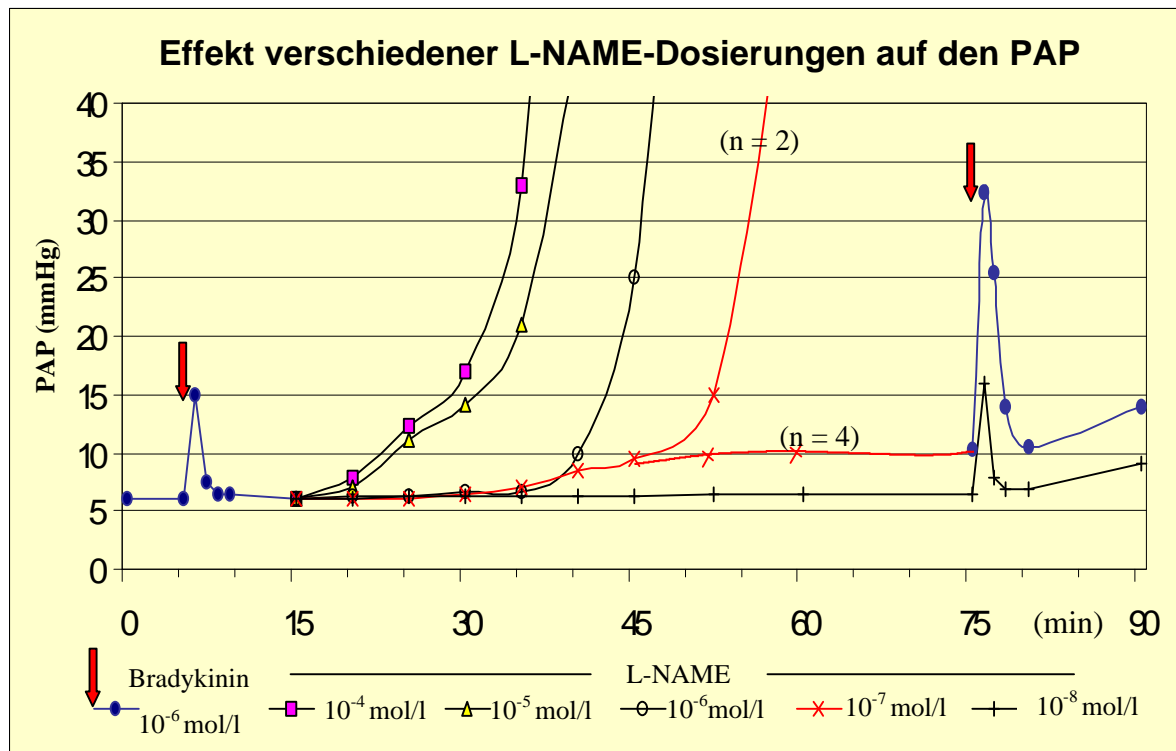
Auch für den NO-Synthasehemmer L-NAME wurden verschiedene Dosierungen getestet, um Aufschlüsse über die in den Versuchsreihen am besten zu verwendende Dosierung zu erhalten.

L-NAME wurde in (10er Potenzen-) abnehmenden Konzentrationen in den Stromkreis appliziert. Höhere Dosierungen (10<sup>-4</sup> mol/l bis 10<sup>-6</sup> mol/l) führten mit unterschiedlicher Latenz direkt zu einem Anstieg des PAP, der bei den beiden höheren Konzentrationen sofort nach Applikation in den Stromkreis begann und sehr steil ausfiel. Die Folge für die isolierte Lunge war jeweils ein sich rasch ausbildendes Lungenödem.

L-NAME in einer Endkonzentration von  $10^{-7}$  mol/l erbrachte bei  $n = 6$  Versuchen divergierende Resultate. Bei zwei der Lungen kam es nach einer Latenz von ca. 20 Minuten ebenfalls zu einem konstanten Druckanstieg mit einem irreversiblen Lungenödem. Bei den vier restlichen Lungen stieg der PAP innerhalb von 45 Minuten einige mmHg – ohne Ödemeinlagerung – an. Nach Ablauf dieser Zeit wurde eine Bradykinin-Injektion ( $10^{-6}$  mol/l) durchgeführt. Der PAP-Anstieg war im Vergleich mit der initialen Bradykinin-Stimulation in gleicher Dosierung deutlich höher. Bereits die Vorversuche deuten somit auf eine wichtige Rolle des NO bezüglich der Regulation des PAP in der Kaninchenlunge hin.

Da eine L-NAME-Dosierung mit einer im Perfusionskreislauf resultierenden Endkonzentration von  $10^{-8}$  mol/l den Effekt einer Bradykinin-Bolusgabe ( $10^{-6}$  mol/l) auf den pulmonalarteriellen Druck nicht verstärken konnte, wurde die L-NAME-Konzentration von  $2 \cdot 10^{-5}$  mol/l – entsprechend einer Endkonzentration von  $10^{-7}$  mol/l – für die nachfolgenden Versuchsreihen gewählt.

Abb. 3.3 gibt einen zusammenfassenden Überblick über die genannten Vorversuche.

**Abb. 3.3**

Das Diagramm stellt eine zusammenfassende Übersicht über die Vorversuchsreihen mit dem NO-Synthasehemmer L-NAME dar. Die Resultate der verschiedenen Reihen [n = 2-3] wurden gemittelt. Lediglich bei der auch in den späteren Versuchsreihen verwendeten Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l wurden n = 6 Versuche durchgeführt.

Initial wurde eine Bradykinin-Applikation ( $10^{-6}$  mol/l) durchgeführt, um eine direkte Vergleichsmöglichkeit zu haben.

Bei einer L-NAME-Konzentration von  $10^{-7}$  mol/l kam es auf die Bradykinin-Bolusgabe ( $10^{-6}$  mol/l) in der 60. Minute zu einer deutlichen Druckverstärkung, wohingegen eine L-NAME-Konzentration von  $10^{-8}$  mol/l keine PAP-Potenzierung hervorrief.

Bei den höheren L-NAME-Konzentrationen wurde aufgrund des spontanen Druckanstiegs keine erneute Bradykinin-Stimulation mehr durchgeführt.

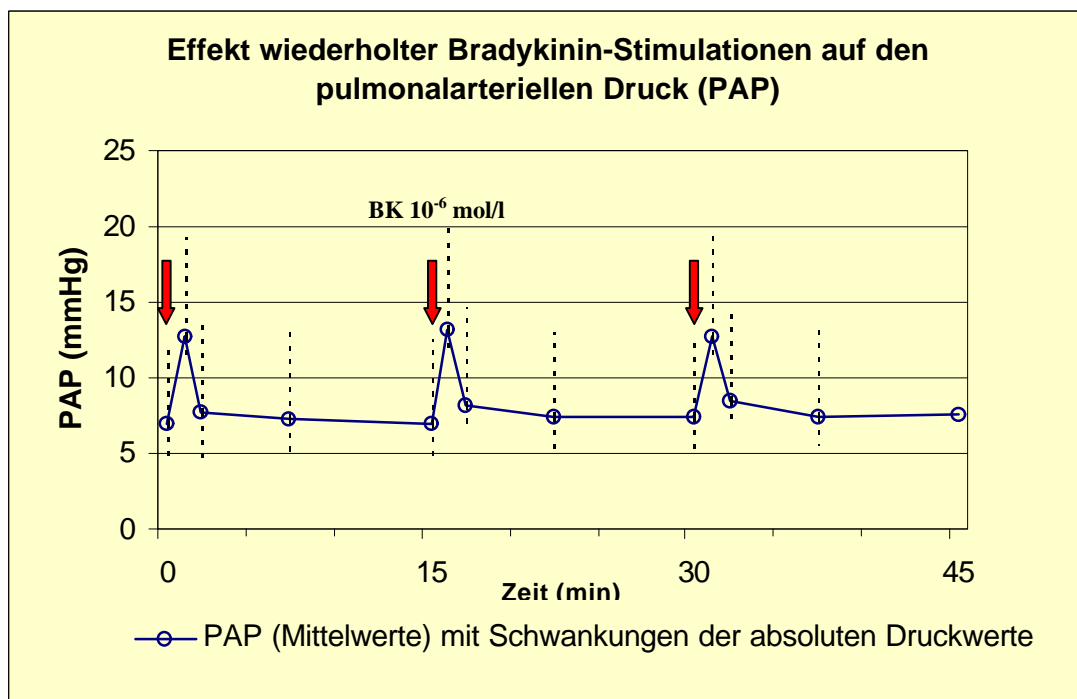
## 3.2 VERSUCHSREIHEN I-IV

### 3.2.1 REAKTIONEN DES PULMONALARTERIELLEN DRUCKS (PAP)

#### 3.2.1.1 WIEDERHOLTE BRADYKININ-BOLUSAPPLIKATIONEN

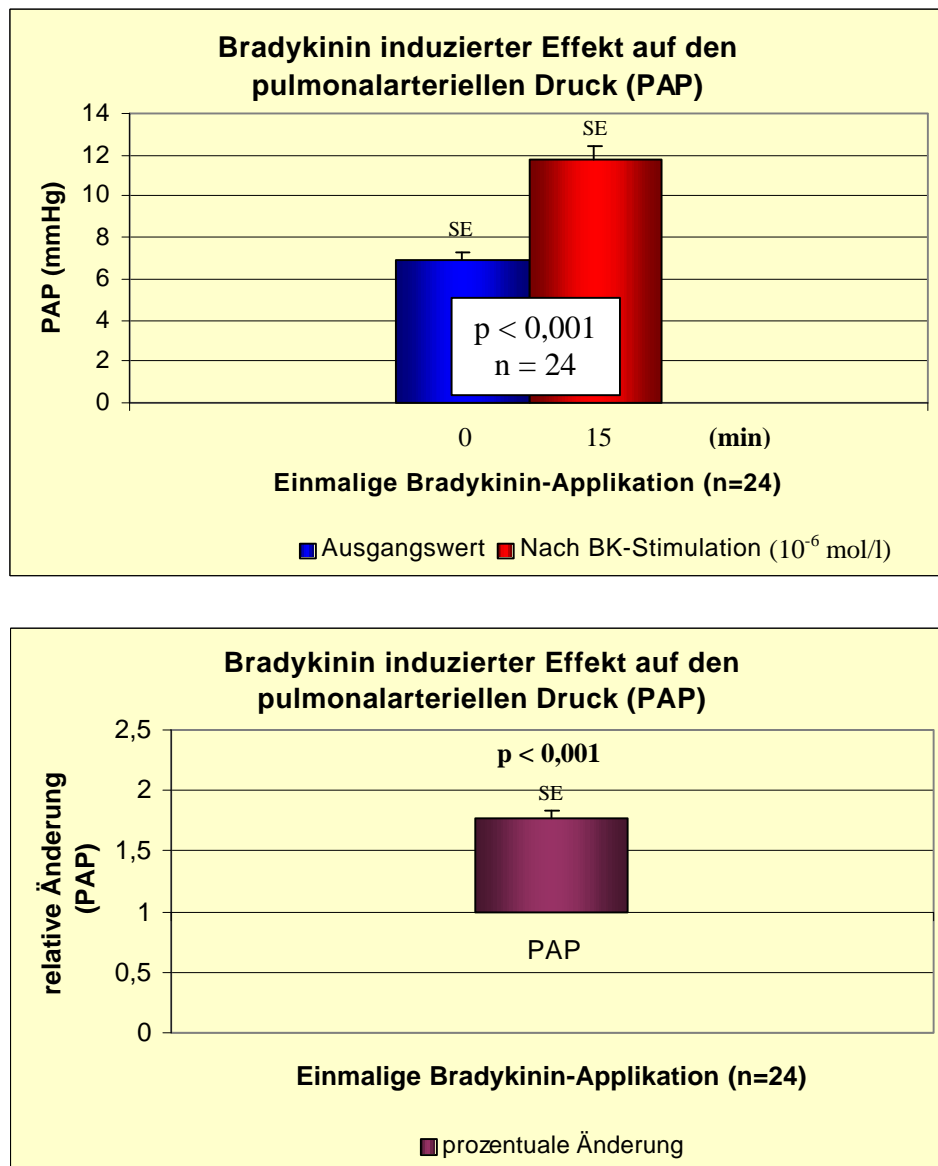
##### (VERSUCHSREIHE I)

Jede Bradykinin-Bolusgabe ( $2 \cdot 10^{-4}$  mol/l) in einem zeitlichen Abstand von 15 Minuten bei einer im Perfusatstromkreis vorliegenden Endkonzentration von  $10^{-6}$  mol/l ergab einen raschen PAP-Anstieg mit einem Druckmaximum nach ca. einer Minute. Diese Druckanstiege waren gut reproduzierbar. Das Maximum der aufeinanderfolgenden Druckspitzen war ohne signifikante Unterschiede und lag bei drei Stimulationen im Durchschnitt  $77,82\% \pm 6,2\%$  (SE) über dem Ausgangswert ( $p < 0,01$ ). Nach Erreichen der Druckspitzen kam es jeweils zu einem kontinuierlichen Absinken des PAP in den Bereich des Ausgangsniveaus. Abb. 3.4 gibt einen grafischen Überblick über diesen Ablauf, die absoluten Werte können der Tabelle 3.1 entnommen werden.



**Abb. 3.4** Verhalten des pulmonalarteriellen Ausgangsdrucks auf wiederholte Bradykinin-Stimulationen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Druckveränderungen als absolute PAP-Werte (mmHg) in Beziehung zum jeweiligen Bradykinin-Applikationszeitpunkt 0, 15 und 30 Minuten. Die gestrichelten Linien geben die relativ breite Streuung der absoluten PAP-Werte zum jeweiligen Meßzeitpunkt an [n=6].

Nach den initialen Bradykinin-Stimulationen **ohne** vorherige Medikamentenapplikation kam es bei den Lungen aller 4 Versuchsreihen [n=24] bei einem mittleren Ausgangsdruck von  $6,88 \pm 0,44$  (SE) mmHg zu einem hochsignifikanten PAP-Anstieg mit einem mittleren Spitzendruck von  $11,75 \pm 0,72$  mmHg (Abb. 3.5).



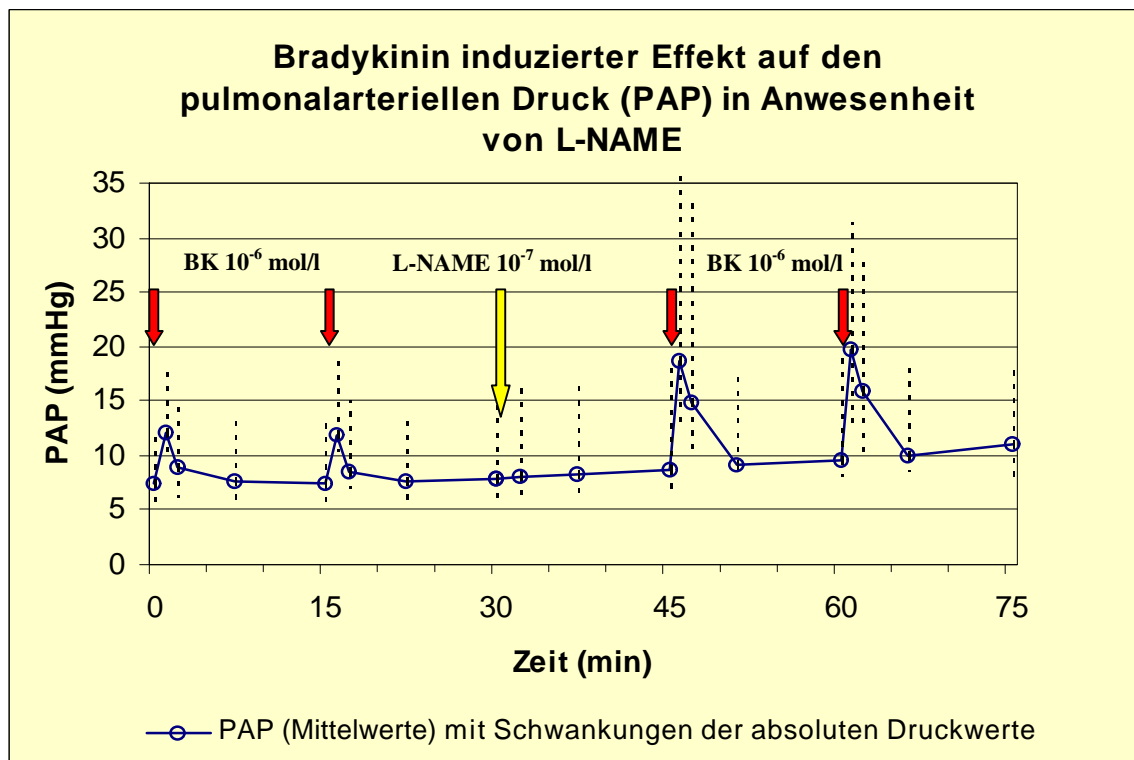
**Abb. 3.5** Die Abbildungen zeigen die PAP-Reaktion nach *einmaliger* Bradykinin-Stimulation (n=24). Oben dargestellt ist der gemittelte Ausgangs- bzw. Spitzendruck als **absoluter** Wert mit dem SE, unten die entsprechende **prozentuale** Änderung mit dem SE ( $p < 0,001$ ).

### 3.2.1.2 EINFLUß EINER NO-SYNTHEHEMMUNG (L-NAME) (VERSUCHSREIHE II)

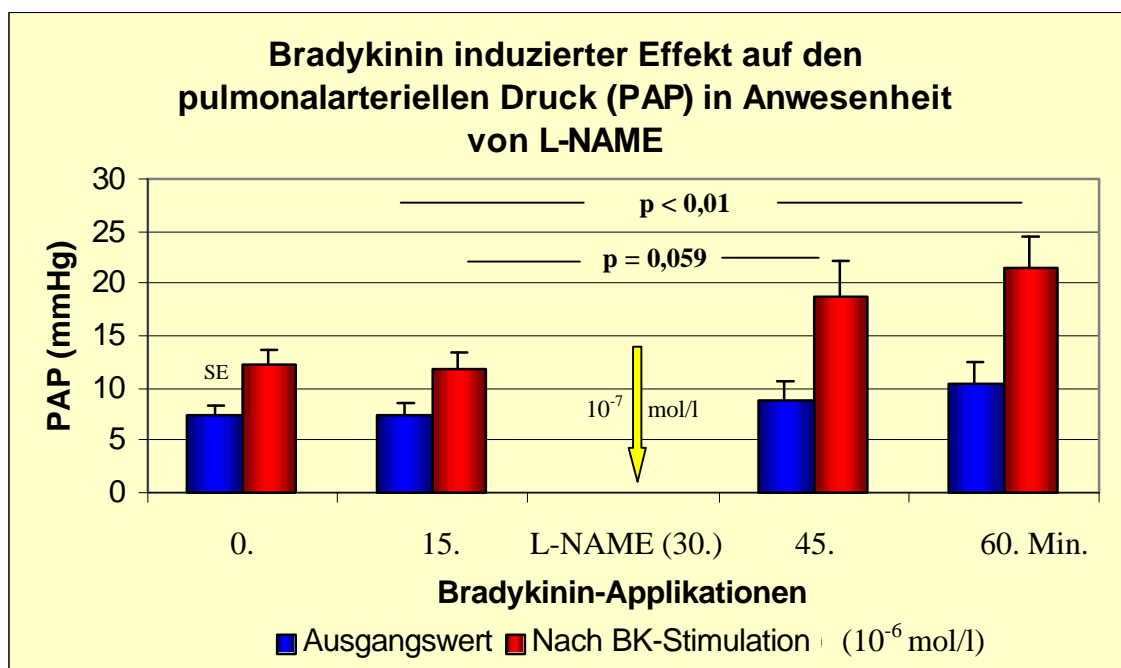
In der 30. Minute wurde – nach zweimaliger BK-Gabe (in Minute 0 und 15) – L-NAME ( $2 \cdot 10^{-5}$  mol/l  $\cong 10^{-7}$  mol/l) in den Kreislauf appliziert. Diese Versuchsreihe sollte dazu beitragen, die Bedeutung von NO für die Regulation des pulmonalarteriellen Drucks nach einer Kinin-Stimulation zu charakterisieren.

Zunächst gilt festzuhalten daß jeder der 4 Bradykinin-induzierten PAP-Anstiege für sich betrachtet signifikant war ( $p < 0,05$ ). Eine Übersicht über den Druckverlauf, die Mittelwerte mit den jeweiligen zugehörigen Standardabweichungen sowie Angaben über die prozentualen Änderungen geben die Abb. 3.6 sowie die Tabelle 3.1.

Vergleicht man die Bradykinin-Stimulation vor L-NAME-Gabe (Zeitpunkt 15. Minute: Ausgangsdruck  $7,41 \pm 1,17$  mmHg, Spitzendruck nach Stimulation  $11,83 \pm 1,52$  mmHg,  $p < 0,05$ ) mit dem Druckverhalten auf Bradykinin nach Gabe des NO-Hemmers in der 45. Minute (Ausgangswert  $8,75 \pm 1,86$  mmHg, nach Stimulation  $18,66 \pm 3,52$  mmHg,  $p < 0,05$ ), so zeigt sich eine durch L-NAME potenzierte Drucksteigerung, die mit  $p = 0,052$  grenzwertig signifikant ist. Setzt man hingegen die Bradykinin-Stimulation in der 60. Minute (Ausgangswert  $10,5 \pm 1,85$  mmHg; Spitzendruck  $21,5 \pm 3,03$  mmHg,  $p < 0,01$ ) in Beziehung zu dem Ausgangswert in der 15. Minute, so ist die durch L-NAME induzierte Drucksteigerung mit  $p < 0,01$  als hochsignifikant einzustufen (Abb. 3.7 und Abb. 3.8).

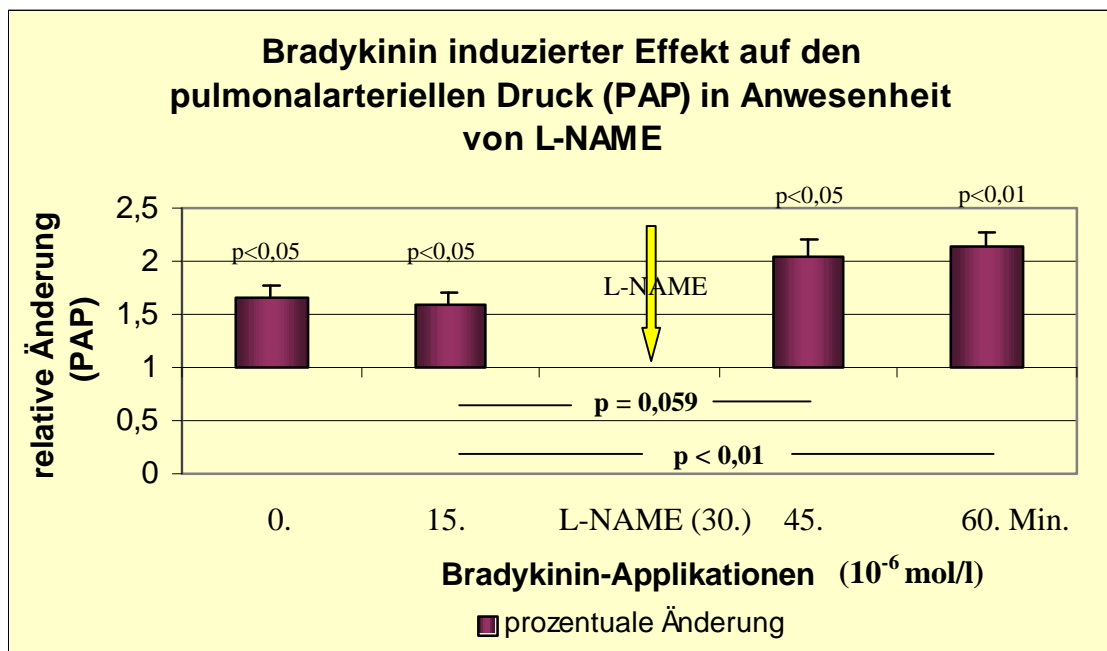


**Abb. 3.6** Das Diagramm zeigt den Verlauf des pulmonalarteriellen Drucks auf Bradykinin-Bolusapplikationen (arithmetische Mittelwerte,  $n = 6$ ) in Anwesenheit des NO-Synthasehemmers L-NAME ab der 30. Minute. Es kommt zu einer Potenzierung des Kinin-induzierten Druckanstiegs. Die gestrichelten Linien geben die Schwankungen der absoluten Druckwerte zwischen den einzelnen isolierten Organen an.



**Abb. 3.7** Direkter Vergleich der Veränderungen des PAP [ $n=6$ ]. Es kommt zu einer Potenzierung der Druckanstiege. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten  $p$  sind eingezeichnet. (SE = Standardfehler)



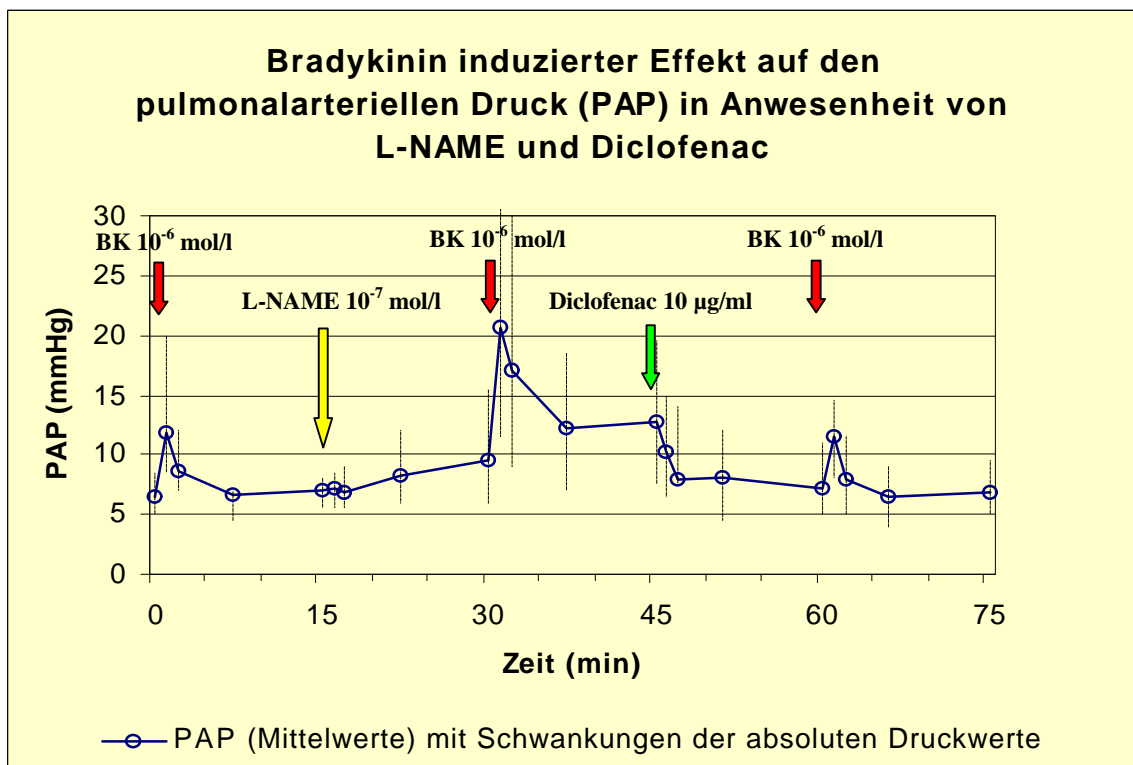
**Abb. 3.8**

Darstellung der relativen Änderungen der jeweiligen PAP-Werte [n=6].

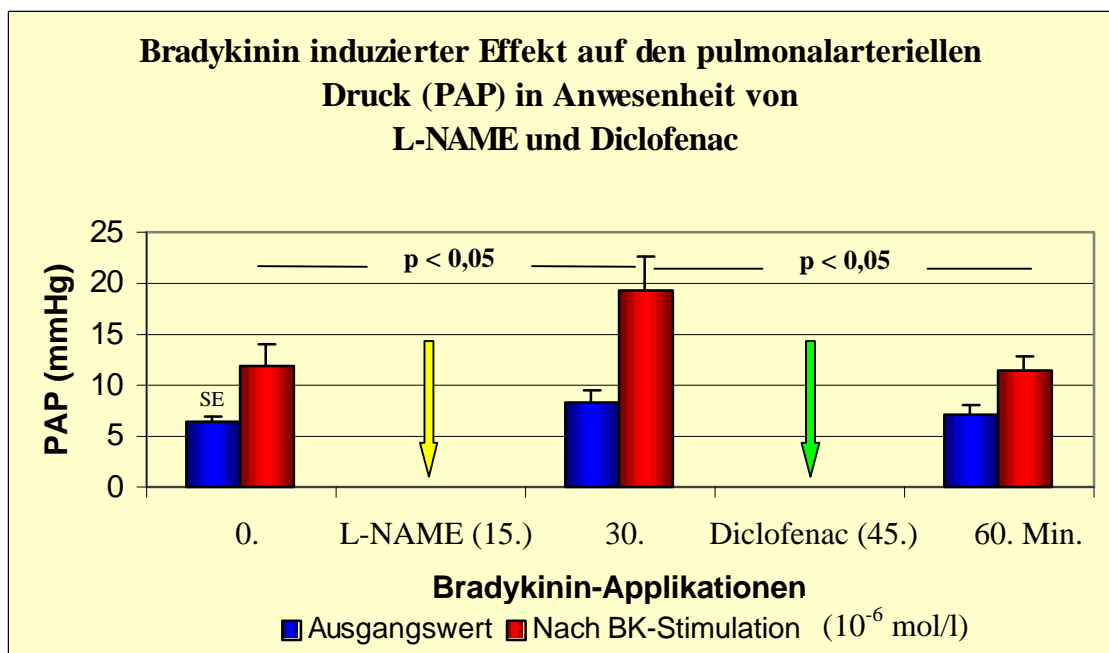
Im oberen Teil des Diagramms sind die statistischen Irrtumswahrscheinlichkeiten für die einzelnen Druckerhöhungen, im unteren Teil die Signifikanzberechnungen für die Druckverhältnisse vor und nach NO-Synthasehemmung dargestellt.

### **3.2.1.3 BRADYKININ-INDUZierter EFFeKT AUf DEN PAP IN ANWESENHEIT VON L-NAME UND NACHFOLGEND DICLOFENAC (VERSUCHSREIHE III)**

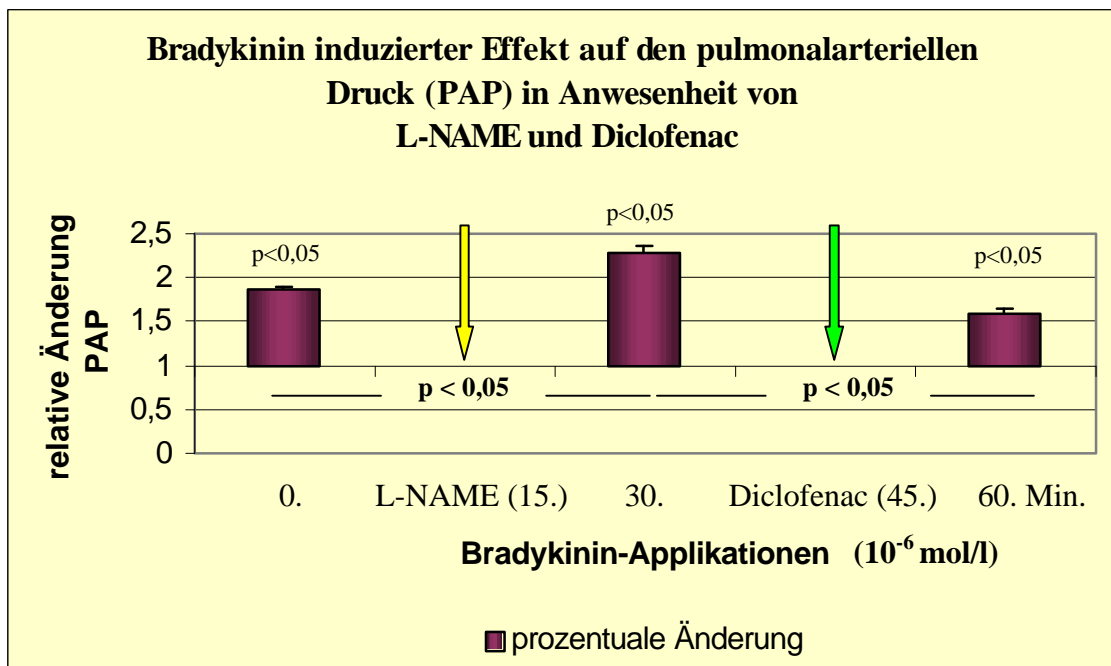
Wie bei der Versuchsreihe II kam es in Anwesenheit des NO-Synthasehemmers L-NAME und nachfolgender Bradykinin-Stimulation zu einer Potenzierung ( $p < 0,05$ ) des Druckanstiegs, dieser lag im Mittel bei  $228,57\% \pm 7,74\%$  (SE). Auffällig bei dieser Versuchsanordnung war jedoch, daß der pulmonalarterielle Druck nach der Bradykiningabe in der 30. Minute nicht mehr vollständig auf den Ausgangswert absank, sondern nach einer initial raschen Druckminderung wieder eine leicht ansteigende Tendenz zeigte. Auf die Diclofenac-Applikation in den Perfusionskreislauf in der 45. Minute kam es dann allerdings zu einer abrupten Druckminderung des PAP, so daß nach max. 10 Minuten wieder das Ausgangsniveau erreicht wurde (Abb. 3.9). Der PAP-Anstieg nach der letzten Bradykinin-Stimulation in der 60. Minute war ohne signifikanten Unterschied zu der ersten Bradykinin-Applikation in Minute 0. (Abb. 3.10 und Abb. 3.11, Tab. 3.1)



**Abb. 3.9** PAP-Werte mit zunächst NO-Synthasehemmung (15') und dann Cyclooxygenasehemmung (45') [n=6]. Beachtenswert ist, daß der PAP-Wert erst nach Gabe von Diclofenac wieder auf das Ausgangsniveau abfällt. Dies deutet auf eine Beteiligung von Cyclooxygenaseprodukten bei der Druckreaktion hin.



**Abb. 3.10** Vergleich der PAP-Reaktionen [n=6]. Der Anstieg des PAP bei der zweiten Bradykinin-Stimulation ist mit  $p < 0,05$  – genau wie die fehlende PAP - Verstärkung bei der Kiningabe in der 60. Minute – signifikant.

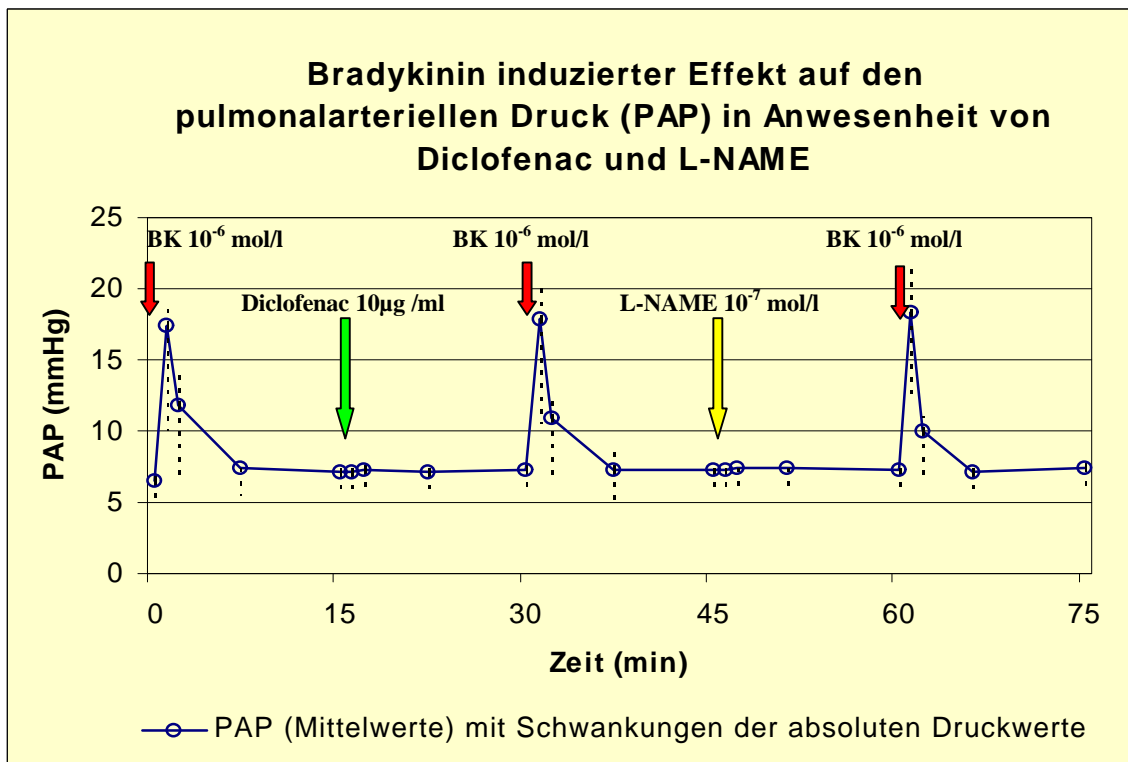


**Abb. 3.11** Darstellung der prozentualen Änderungen des PAP in Versuchsreihe III [n=6]. Weitere Erläuterungen im Text.

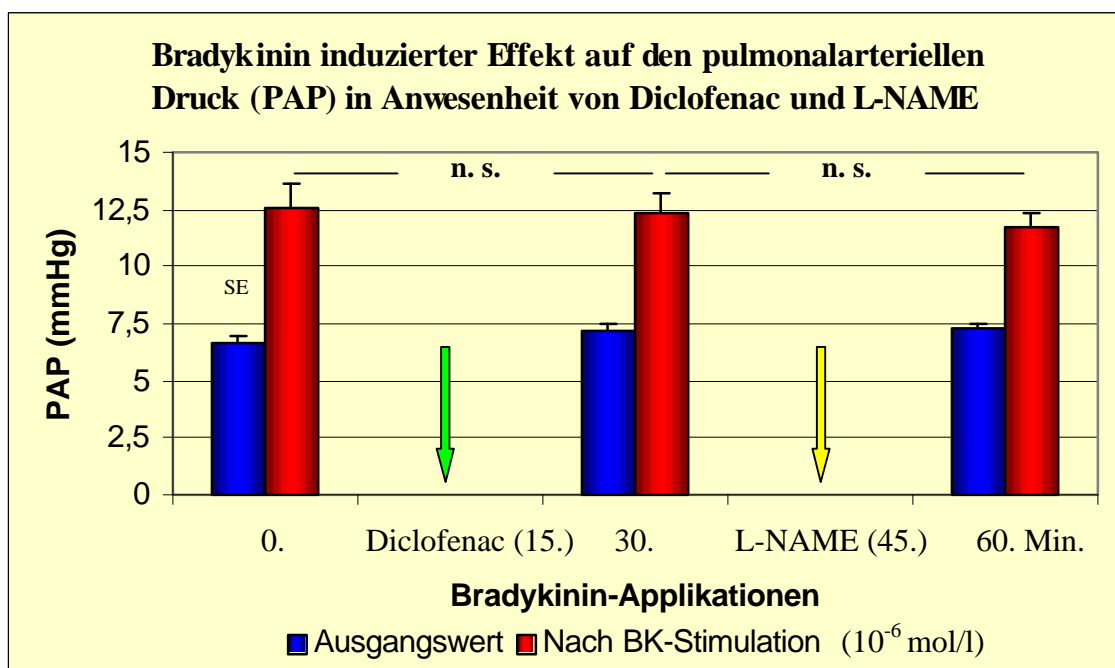
#### 3.2.1.4 BRADYKININ-INDUZierter EFFeKT AUf DEN PAP IN ANWESENHEIT VON DICLOFENAC UND NACHFOLGEND L-NAME (VERSUCHSREIHE IV)

In Ergänzung zur Versuchsreihe III wurde hier der Applikationszeitpunkt des NO-Synthase- bzw. Cyclooxygenase-Hemmers vertauscht.

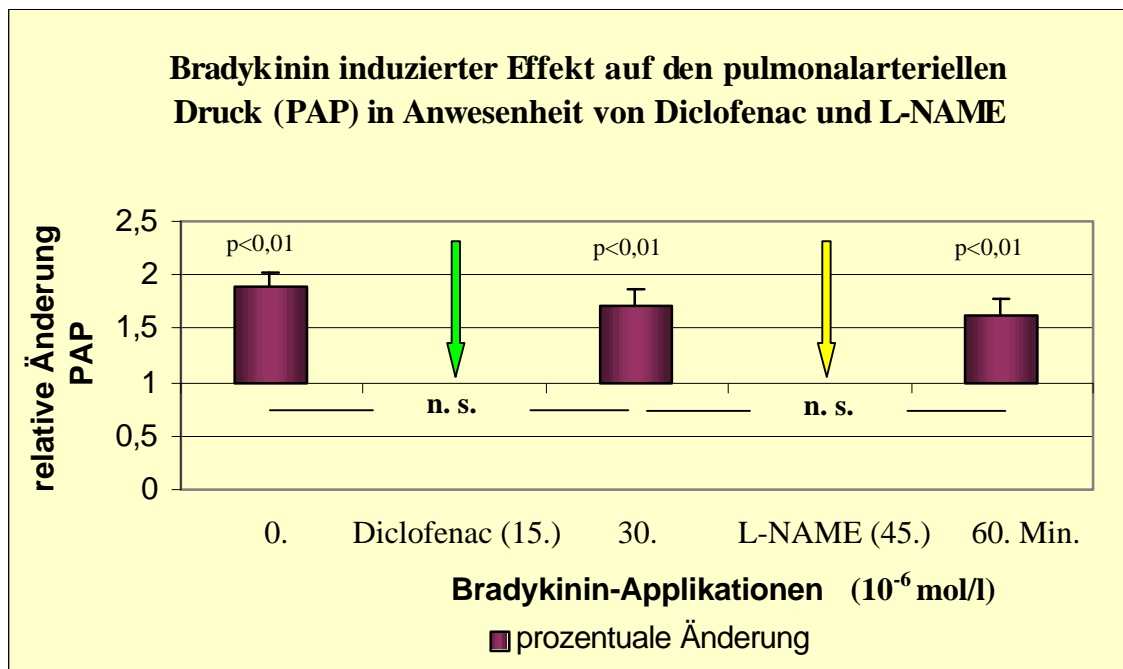
Es kam hier nach den Bradykinin-Bolusgaben in Minute 0, 30 und 60 zu jeweils hochsignifikanten ( $p < 0,01$ ) PAP-Anstiegen (Abb. 3.12). Im Vergleich untereinander waren die Druckspitzen nach Bradykinin-Bolusapplikation allerdings ohne signifikante Unterschiede. Somit ist Diclofenac über eine Cyclooxygenasehemmung offensichtlich in der Lage, die durch L-NAME induzierte Druckpotenzierung zu verhindern. Auch hier geben die Abb. 3.13. und Abb. 3.14 sowie die Tab. 3.1 einen zusammenfassenden Überblick über die absoluten Werte bzw. die prozentualen Änderungen.



**Abb. 3.12** Wird der Cyclooxygenasehemmer vor der NO-Synthasehemmung gegeben, so wird die Potenzierung des PAP-Anstieges verhindert [n=6]. Die drei PAP-Reaktionen unterscheiden sich in ihren Spitzenwerten nicht signifikant.



**Abb. 3.13** Zwischen den einzelnen Druckreaktionen bestehen keine signifikante Unterschiede, wenn Diclofenac vor L-NAME appliziert wird [n=6].



**Abb. 3.14** Darstellung der relativen Änderungen des PAP in der Versuchsreihe IV [n=6]. Zwischen den einzelnen Druckreaktionen bestehen keine signifikanten Unterschiede. Allerdings wird durch Diclofenac die *Potenzierung* des PAP durch L-NAME verhindert. Die auch aus den Vorversuchen bekannten Bradykinin-induzierten PAP-Anstiege bleiben unverändert und statistisch hochsignifikant ( $p<0,01$ ).

### 3.2.2 AUSSCHÜTTUNG VON PROSTAZYKLIN UND THROMBOXAN A<sub>2</sub> INFOLGE VON BRADYKININ-STIMULATIONEN

Jeweils vor den Bolusgaben von Bradykinin, L-NAME und Diclofenac wurde eine Perfusatprobe aus dem Kreislauf entnommen und auf die stabilen Abbauprodukte von Prostazyklin und Thromboxan A<sub>2</sub> (6-keto-PGF<sub>1α</sub> bzw. TXB<sub>2</sub>) untersucht. Die letzte Perfusatprobe wurde 15 Minuten nach der letzten Pharmakongabe (d.h. in der 75. Minute des Versuchsverlaufs) aus dem Kreislauf aspiriert.

Daß es durch Bradykinin auch in der isolierten Kaninchenlunge zu einer Aktivierung des Arachidonsäuresystems kam, zeigte bereits der Effekt des Cyclooxygenasehemmers Diclofenac bei der Auswertung der PAP-Reaktionen.

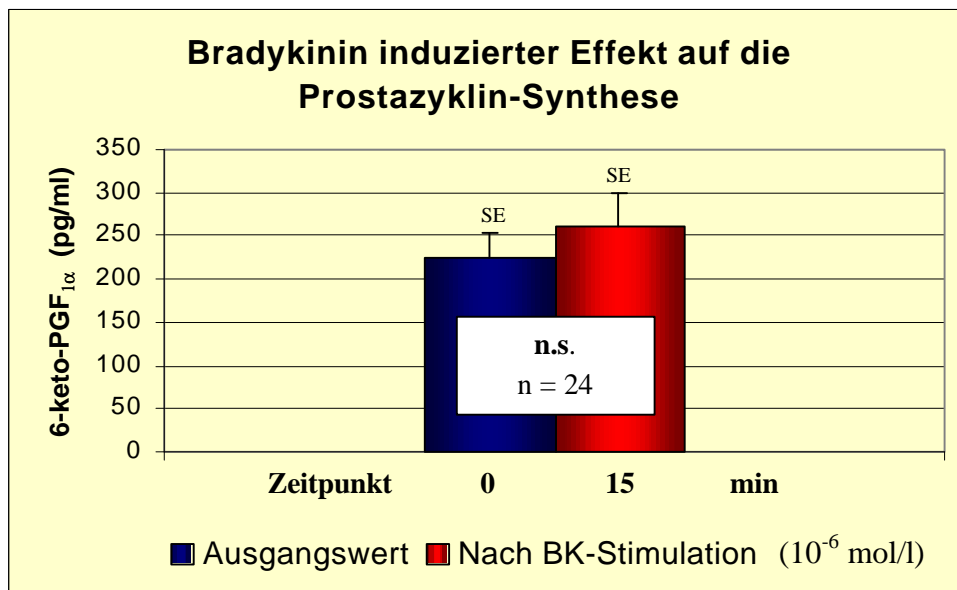
Nachfolgend soll die Ausschüttung der beiden Metaboliten TXA<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub> - ebenso wie die PAP-Reaktionen - für jede Versuchsreihe getrennt dargestellt werden.

#### 3.2.2.1 ALLEINIGE BRADYKININ-STIMULATION (VERSUCHSREIHE I)

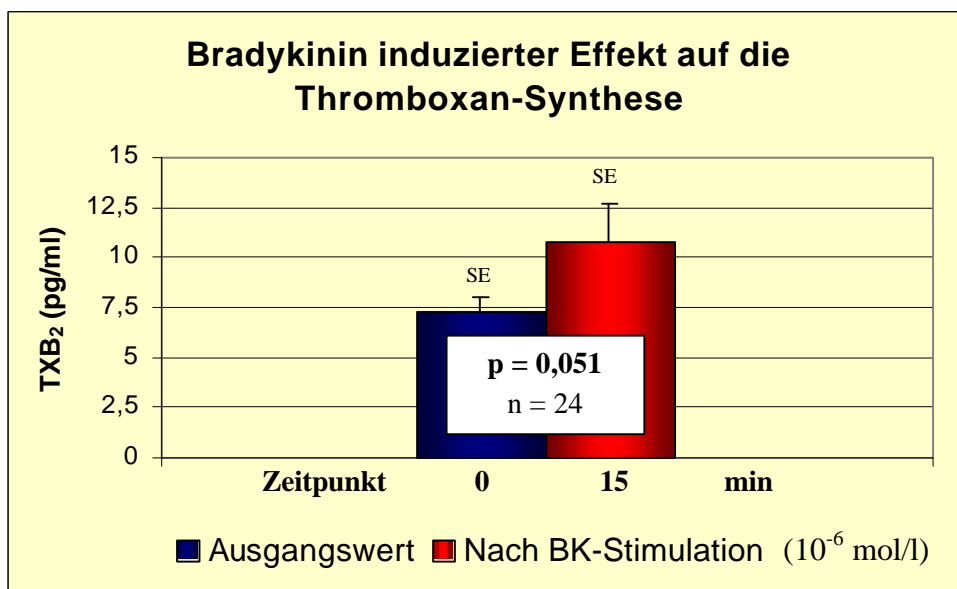
Nach einer Bradykinin-Stimulation (n = 24) kam es bei den absoluten Werten zu einem mittleren Anstieg des PGI<sub>2</sub>-Spiegels von  $223,49 \pm 29,83$  (SE) pg/ml auf  $259,82 \pm 39,24$  pg/ml, dieser Anstieg war allerdings statistisch nicht signifikant (p = 0,233) (Abb. 3.15, Tab. 3.1).

Der TXB<sub>2</sub>-Spiegel stieg im Mittel (n = 24) von  $7,31 \pm 0,69$  pg/ml auf  $10,78 \pm 1,89$  pg/ml. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p = 0,051 ist statistisch noch eine Signifikanz für einen durch Bradykinin induzierten Anstieg des TXA<sub>2</sub> anzunehmen. (Abb. 3.16, Tab. 3.1) Zu berücksichtigen ist, daß die absoluten Mengen an ausgeschüttetem TXA<sub>2</sub> (respektive TXB<sub>2</sub>) sehr gering sind und im unteren

Nachweisbereich des verwendeten Testverfahrens liegen, so daß hier meßtechnische Einflüsse möglicherweise mit berücksichtigt werden müssen. Hierauf soll im Rahmen der Diskussion noch näher eingegangen werden.



**Abb. 3.15** Bradykinin-induzierte PGI<sub>2</sub>-Synthese.  
Der Anstieg nach einer BK-Stimulation [n=24] ist allerdings statistisch nicht signifikant.



**Abb. 3.16** Bradykinin-induzierte TXB<sub>2</sub>-Synthese.  
Im Gegensatz zu der PGI<sub>2</sub>-Produktion kann hier bei p=0,051 [n=24] noch von einem signifikanten Anstieg nach einer einmaligen Bradykinin-Bolusgabe ausgegangen werden.



### 3.2.2.2 EINFLUSS VON L-NAME

#### (VERSUCHSREIHE II)

Identisch zur Versuchsreihe I war die Prostazyklin-Ausschüttung nach den ersten beiden Bradykinin-Stimulationen statistisch nicht signifikant. Nach Applikation des L-NAME und erneuten Bradykinin-Boli waren zwar die im Perfusat gemessenen absoluten Mengen an 6-keto-PGF<sub>1α</sub> erhöht, allerdings konnte auch für die beiden letzten Bradykinin-Applikationen in die Lungenstrombahn – bei jeweils hohem SE – kein statistisch signifikanter Anstieg des 6-keto-PGF<sub>1α</sub> errechnet werden (Abb. 3.17, Tab. 3.1).

Ein identisches Verhalten zeigte auch die TXA<sub>2</sub>-Ausschüttung. Auch hier ergab sich – trotz NO-Synthasehemmung – bezogen auf die einzelnen Bradykinin-Applikationen jeweils kein signifikanter Anstieg (n = 6) (Abb. 3.18).

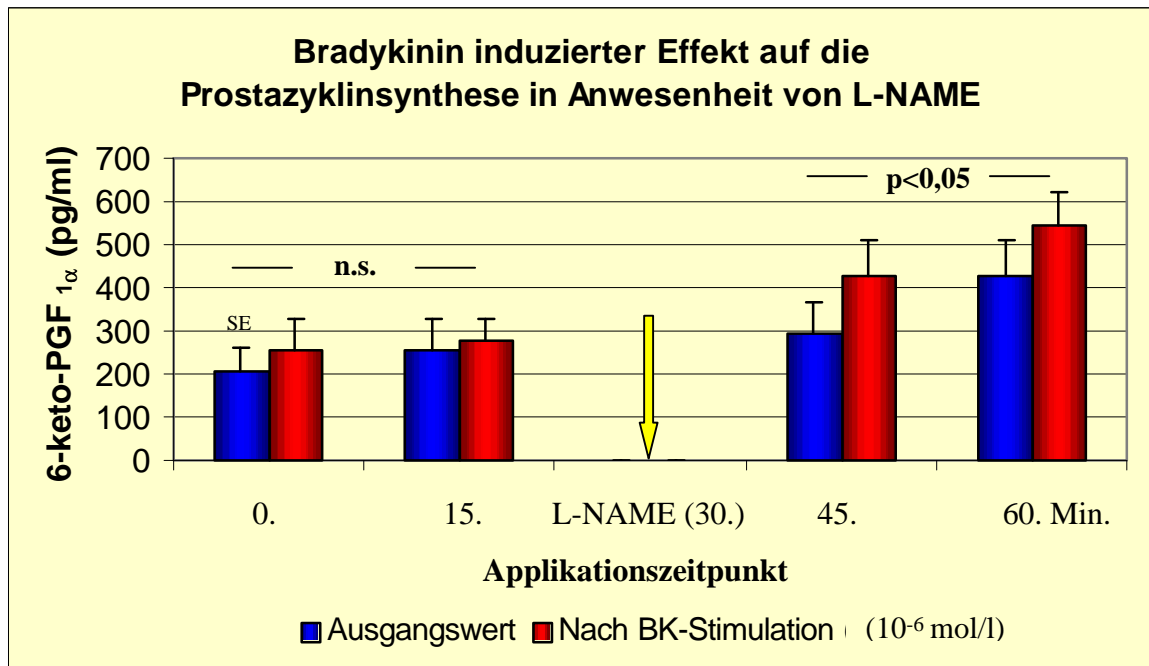
Betrachtet man darüber hinaus isoliert den Anstieg des TXB<sub>2</sub> nach der ersten Bradykinin-Stimulation (Minuten 0 und 15) so ist die statistische Aussagekraft, daß die TXB<sub>2</sub>-Konzentration vor der Stimulation geringer ist als danach mit  $p = 0,1685$  ebenfalls als nicht signifikant zu bewerten. Vergleicht man diese Ergebnisse wiederum mit den Resultaten der Versuchsreihe I, in der bei Zusammenfassung eines größeren Kollektivs (n = 24) von „Bradykinin-Erststimulationen“ noch ein signifikanter TXB<sub>2</sub>-Anstieg ( $p = 0,05$ ) errechnet wurde, so kann auf eine relativ breite Streuung der TXA<sub>2</sub>-Ausschüttung im biologischen System der Kaninchenlunge rückgeschlossen werden (Tab 3.1).

Nimmt man bei dem 6-keto-PGF<sub>1α</sub> den Perfusat-Ausgangswert vor der 3. Bradykinin-Stimulation (45. Minute,  $292,3 \pm 74,6$  pg/ml) und vergleicht diesen mit dem Mittelwert in der 75. Minute ( $542,2 \pm 77,9$  pg/ml), d.h. nach dem letzten BK-Bolus,

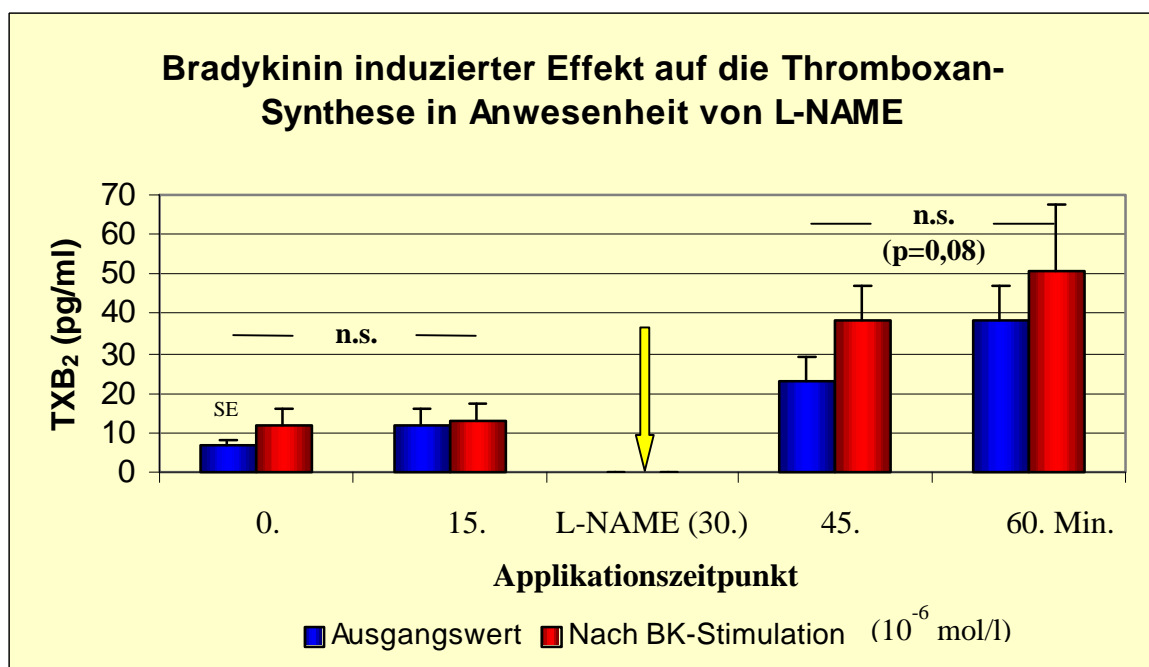
so ergibt sich allerdings ein in Anwesenheit von L-NAME statistisch signifikanter Anstieg des stabilen Metaboliten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$ . Ein solcher Anstieg war nach den ersten beiden Bradykinin-Stimulationen nicht nachweisbar (Abb. 3.17).

Für das TXB<sub>2</sub> fällt dieser Vergleich bezogen auf die jeweiligen Einzelapplikationen von Bradykinin in Anwesenheit von L-NAME statistisch ungünstiger aus, der Anstieg von  $23,16 \pm 6,1$  pg/ml (45. Minute) auf  $51,0 \pm 16,7$  pg/ml (75. Minute) ist mit einem  $p = 0,08$  nicht signifikant (Abb. 3.18).

Kumuliert man allerdings die Stimulationen von jeweils zwei Bradykinin-Applikationen vor bzw. nach NO-Synthasehemmung mittels L-NAME, so ergibt sich sowohl für das PGI<sub>2</sub> als auch für das TXA<sub>2</sub> eine signifikant gesteigerte Ausschüttung in Anwesenheit von L-NAME (Abb. 3.19 und 3.20). Hierauf wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.



**Abb. 3.17** Bradykinin-induzierter Anstieg des PGI<sub>2</sub> vor und nach L-NAME-Gabe [n=6]. Auch hier sind die einzelnen 6-keto-PGF<sub>1α</sub> nicht signifikant (Tab. 3.1). Betrachtet man jeweils die zusammengefaßten Anstiege nach zwei Bradykinin-Stimulationen vor bzw. nach der L-NAME-Applikation, so ist der Anstieg des PGI<sub>2</sub> nach Gabe des NO-Synthasehemmers signifikant (p<0,05).



**Abb. 3.18** Bradykinin-induzierter Anstieg des TXB<sub>2</sub> vor und nach L-NAME-Gabe [n=6]. Die TXB<sub>2</sub>-Anstiege sind – im Gegensatz zur 6-keto-PGF<sub>1α</sub>-Ausschüttung – in Anwesenheit des NO-Synthasehemmers nicht signifikant (n.s.). Siehe diesbezüglich auch Abb. 3.19 und 3.20 bzw. weitere Erläuterungen im Text.

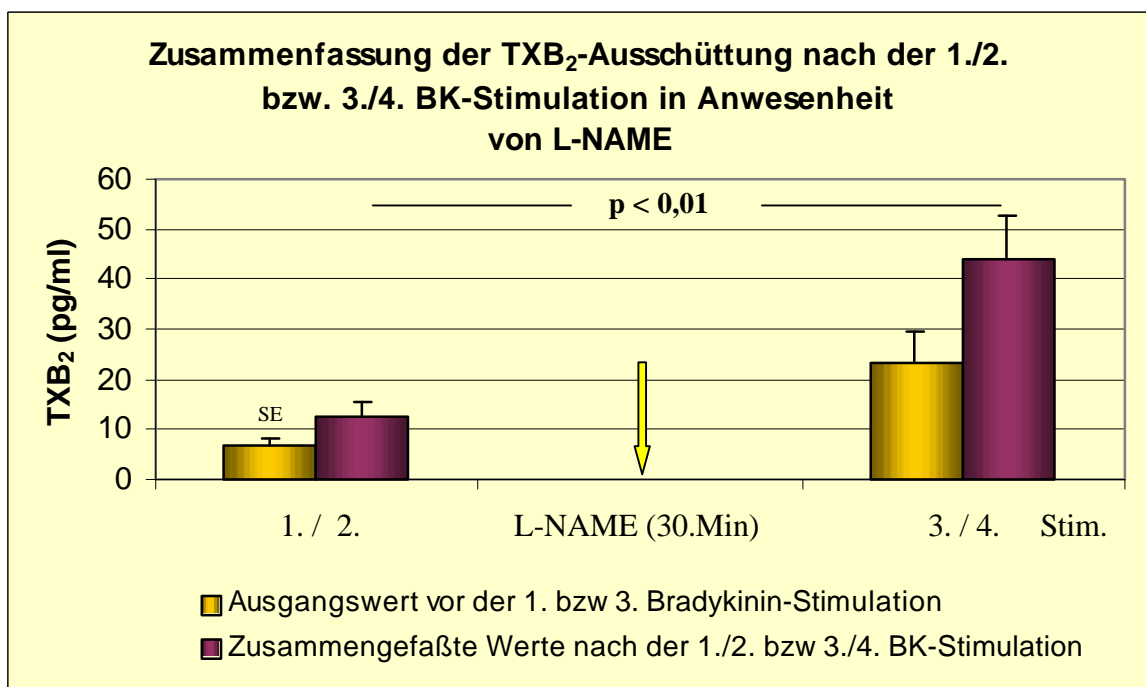
Die Tatsache, daß in Anwesenheit von L-NAME die Ausschüttung der beiden Arachidonsäuremetaboliten signifikant gesteigert ist, wird durch die folgenden statistischen Berechnungen unterstützt.

Um die gemessenen, deutlich höheren absoluten Werte der beiden Arachidonsäuremetaboliten nach einer NO-Synthasehemmung entsprechend zu berücksichtigen, wurden die Werte der beiden stabilen Metabolite jeweils *vor* bzw. *nach* der NO-Synthasehemmung (d.h. die absoluten Werte nach der 1. und 2. bzw. nach der 3. und 4. Bradykinin-Stimulation) zusammengefaßt und mit den Ausgangswerten zum Zeitpunkt 0 bzw. mit dem Basalwert in der 45. Minute verglichen ( $n = 2 * 6 = 12$ ) (Abb. 3.19 und Abb. 3.20)

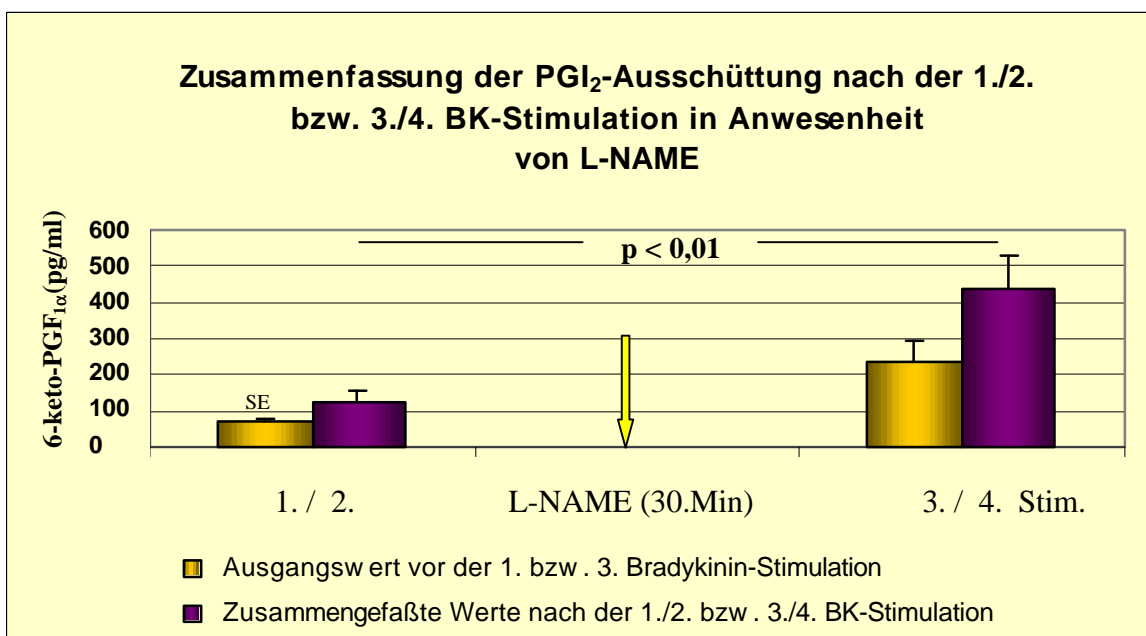
Hier zeigte sich, daß die Gesamtmenge des ausgeschütteten 6-keto-PGF<sub>1α</sub> in Anwesenheit des L-NAME signifikant höher ist ( $485,25 \pm 44,17$  pg/ml) als vor Applikation des NO-Synthasehemmers ( $264,94 \pm 57,68$  pg/ml), die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt hier hochsignifikant bei  $p < 0,01$  (Abb. 3.19).

Für das TXB<sub>2</sub> zeigt eine identische Berechnung, daß auch dieser stabile Metabolit durch eine NO-Synthasehemmung von  $12,5 \pm 2,99$  pg/ml auf  $44,0 \pm 8,76$  pg/ml (Kumulationswerte von jeweils zwei Bradykinin-Stimulationen) ansteigt. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,01$  läßt sich daher festhalten, daß auch die Bradykinin-induzierte TXB<sub>2</sub>-Ausschüttung in Anwesenheit von L-NAME signifikant gesteigert ist (Abb. 3.20).

Auf die pathophysiologische Bedeutung dieser erhöhten Synthese von Arachidonsäure-Metaboliten für die Regulation des pulmonalarteriellen Drucks wird im Rahmen der Diskussion noch näher einzugehen sein.



**Abb. 3.19** Bradykinin-induzierter Anstieg des TXB<sub>2</sub> vor und nach L-NAME-Gabe [n=6]. Die Werte der in der Legende genannten Zeitpunkte vor und nach der NO-Synthasehemmung wurden kumuliert. Statistisch hochsignifikant ergibt sich somit eine Steigerung der TXB<sub>2</sub>-Synthese.



**Abb. 3.20** Bradykinin-induzierter Anstieg des PGI<sub>2</sub> vor und nach L-NAME-Gabe [n=6]. Auch hier wurden jeweils zwei Messungen der PGI<sub>2</sub>-Spiegel vor und nach der L-NAME-Applikation zusammengefaßt; diese Steigerung ist mit p<0,01 ebenfalls signifikant.

### 3.2.2.3 EINFLUß VON L-NAME UND NACHFOLGEND DICLOFENAC (VERSUCHSREIHE III)

Bei der Auswertung der Druckveränderungen fiel bereits auf, daß der *verstärkte* Anstieg des PAP infolge der Bradykinin-Stimulationen in Anwesenheit von Diclofenac verhindert wurde. Demnach müssen Cyclooxygenase-Produkte mit zur Potenzierung der Druckantwort beitragen.

Genau wie in Versuchsreihe II sind auch in dieser Versuchsanordnung die Einzelanstiege nach den drei Bradykinin-Applikationen jeweils für sich betrachtet rechnerisch nicht signifikant. Eine Ausnahme stellt hier lediglich die 6-keto-PGF<sub>1α</sub> -Messung nach der Bradykinin-Bolusgabe in der 30. Minute dar ( $p < 0,05$ ) (Tab. 3.1).

Auch hier müssen aber die im Verlauf deutlich angestiegenen absoluten Werten für die Thromboxan A<sub>2</sub>- bzw. PGI<sub>2</sub>-Produktion berücksichtigt werden. Vergleicht man die mittleren Ausgangswerte im Perfusat vor der ersten (Zeitpunkt 0) bzw. letzten (Zeitpunkt 60. Minute) Bradykinin-Applikation, so ergibt sich für das 6-keto-PGF<sub>1α</sub> ein Anstieg von  $179,42 \pm 40,24$  pg/ml auf  $426,57 \pm 57,24$  pg/ml ( $p < 0,01$ ) (Abb.3.21), für das TXB<sub>2</sub> ein Anstieg von  $9,0 \pm 2,12$  pg/ml auf  $35,25 \pm 13,24$  pg/ml ( $p < 0,05$ ) (Abb. 3.22).

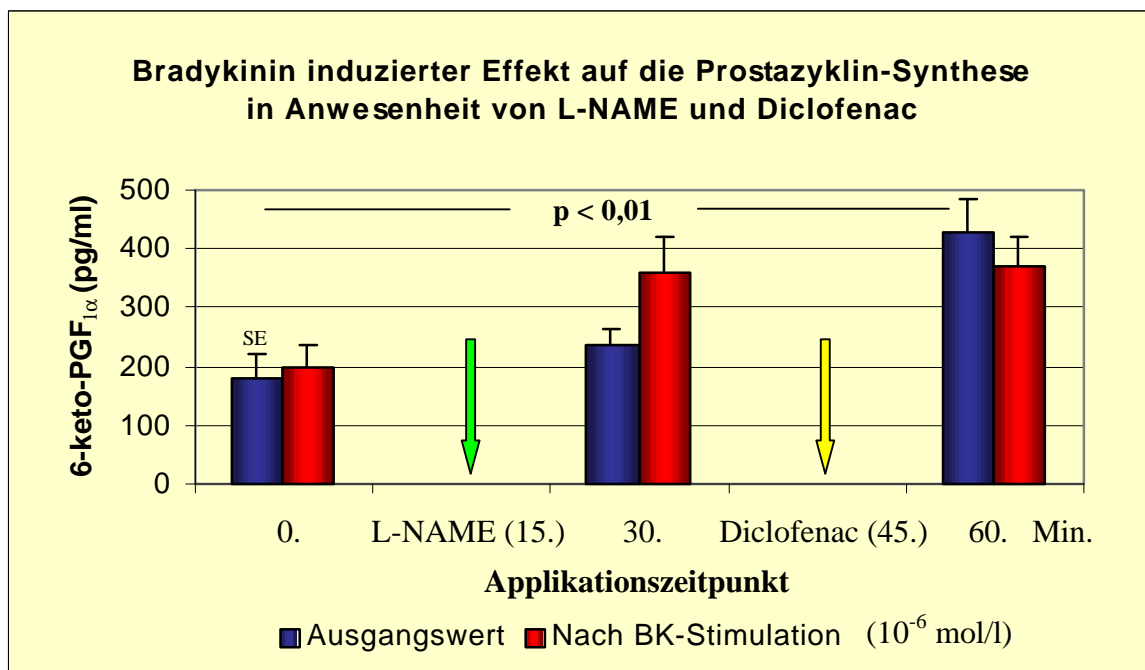
In Anwesenheit des Diclofenac sinken die absoluten TXB<sub>2</sub>-Werte nach der letzten Bradykinin-Stimulation (Minute 60) von  $35,35 \pm 13,24$  pg/ml auf  $15,75 \pm 6,55$  pg/ml, bei der insgesamt aber breiten Streubreite der Werte ist rechnerisch eine sichere Signifikanz ( $p = 0,12$ ) allerdings nicht festzustellen.

Ein vergleichbares Resultat ergibt sich auch für das 6-keto-PGF<sub>1α</sub>. Hier sinken die Konzentrationen in Anwesenheit der Cyclooxygenasehemmung von  $426,57 \pm 57,24$

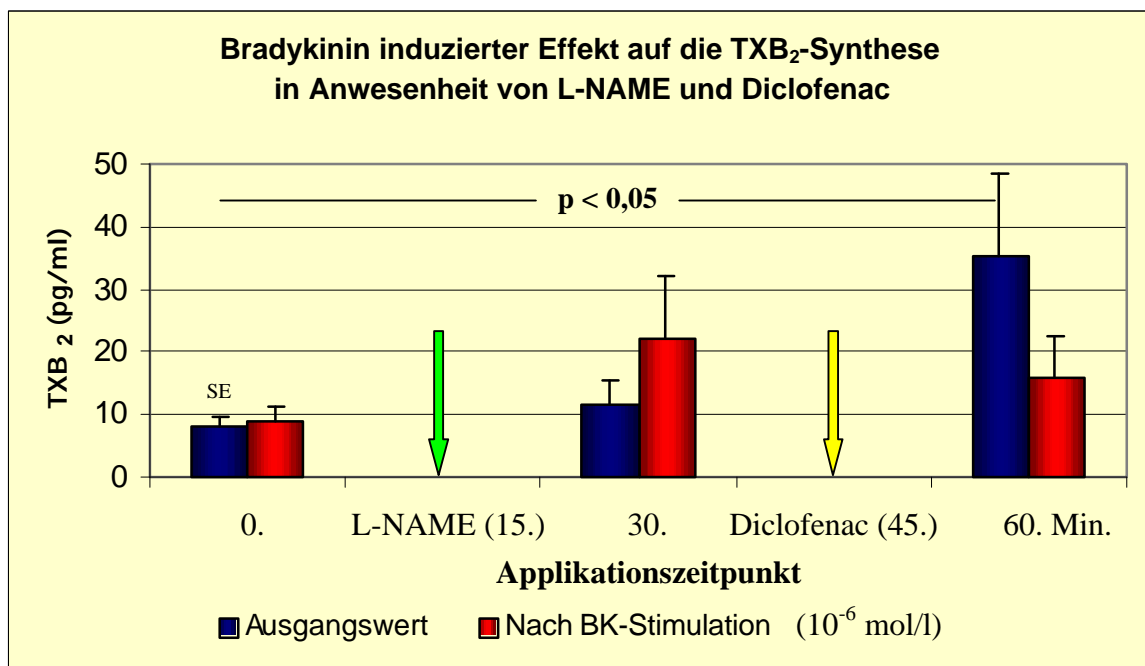
pg/ml auf  $370,37 \pm 48,07$  pg/ml, bei  $p = 0,24$  liegt allerdings auch hier hinsichtlich der statistischen Aussagekraft eine hohe Irrtumswahrscheinlichkeit vor (Tab. 3.1).

Zusammenfassend gilt es festzuhalten, daß durch L-NAME die Bradykinin-induzierte TXA<sub>2</sub>- bzw. PGI<sub>2</sub>-Synthese jeweils signifikant gesteigert wird, und dieser Anstieg wiederum durch Diclofenac verhindert werden kann.

Auffällig bei den Messungen des 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> - bzw. TXB<sub>2</sub>-Spiegels ist eine Zunahme der beiden Metaboliten im Perfusat in der 60. Minute im Vergleich mit den beschriebenen Spitzenwerten in der 45. Minute *trotz* Gabe des Diclofenacs (Abb. 3.21 und 3.22). Dieser scheinbare Anstieg unter einem Cyclooxygenasehemmer ist wohl am ehesten ein Hinweis auf die intensive Metaboliten-Synthese – bzw. deren noch weiterlaufenden Hydrolyse zu den stabilen aber inaktiven Endprodukten – infolge der vorausgegangenen Bradykinin-Stimulation in der 30. Minute.



**Abb. 3.21** Bradykinin-induzierter Anstieg des PGI<sub>2</sub> in Anwesenheit von L-NAME und Diclofenac [n=6].  
Nach Gabe von Diclofenac kommt es zu keinem Anstieg des 6-keto-PGF<sub>1α</sub> mehr. Nähere Erläuterungen im Text



**Abb. 3.22** Bradykinin-induzierter Anstieg des TXB<sub>2</sub> in Anwesenheit von L-NAME und Diclofenac [n=6].  
Der Anstieg des TXB<sub>2</sub> wird durch die Cyclooxygenasehemmung nachweisbar verhindert. Nähere Erläuterungen im Text.



### 3.2.2.4 EINFLUß VON DICLOFENAC UND NACHFOLGEND L-NAME

#### (VERSUCHSREIHE IV)

Diese Versuchsanordnung wurde in Ergänzung zur Versuchsreihe III durchgeführt.

Der Applikationszeitpunkt der beiden verwendeten Hemmer wurde vertauscht.

Entsprechend dem Verhalten der PAP-Reaktion kommt es auch hinsichtlich der Ausschüttung der beiden Arachidonsäuremetaboliten  $\text{PGI}_2$  bzw.  $\text{TXA}_2$  zu keinen signifikanten Änderungen im Vergleich zwischen den einzelnen Bradykinin-Stimulationen.

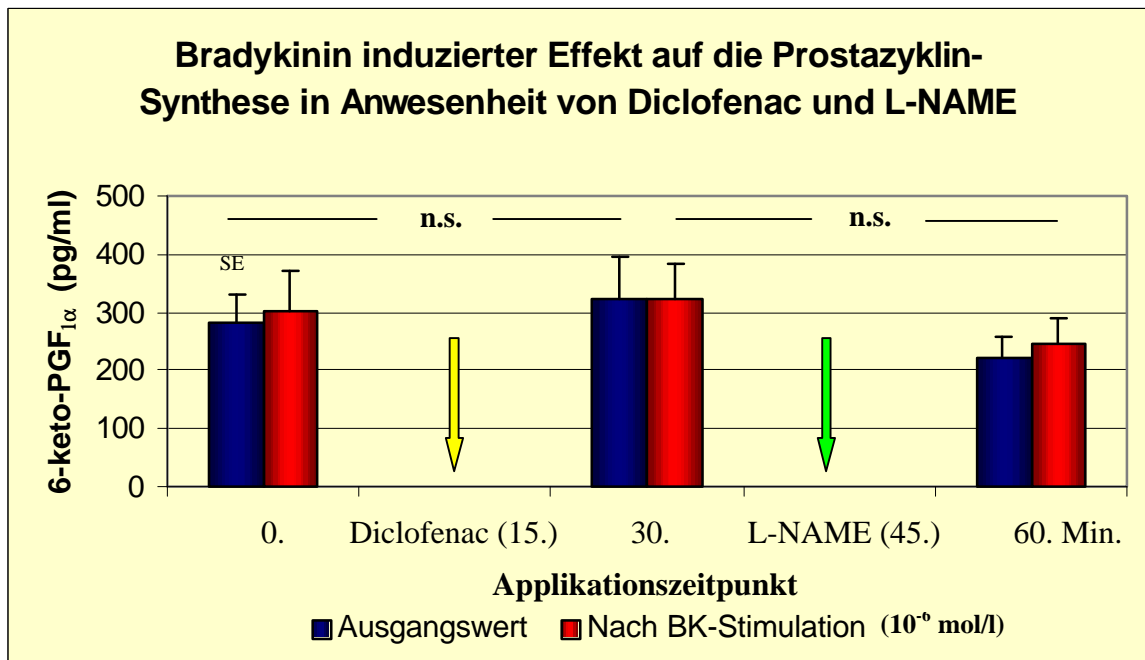
Insbesondere treten nach Applikation des Cyclooxygenasehemmers in der 15. Minute im weiteren Verlauf die in den Versuchsreihen II und III beobachteten absoluten Anstiege von 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$  und  $\text{TXB}_2$  nach einer NO-Synthasehemmung nicht mehr auf (Tab. 3.1).

Auch die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Änderungen der im Perfusat gemessenen stabilen Metabolite nach den drei Bradykinin-Bolusgaben.

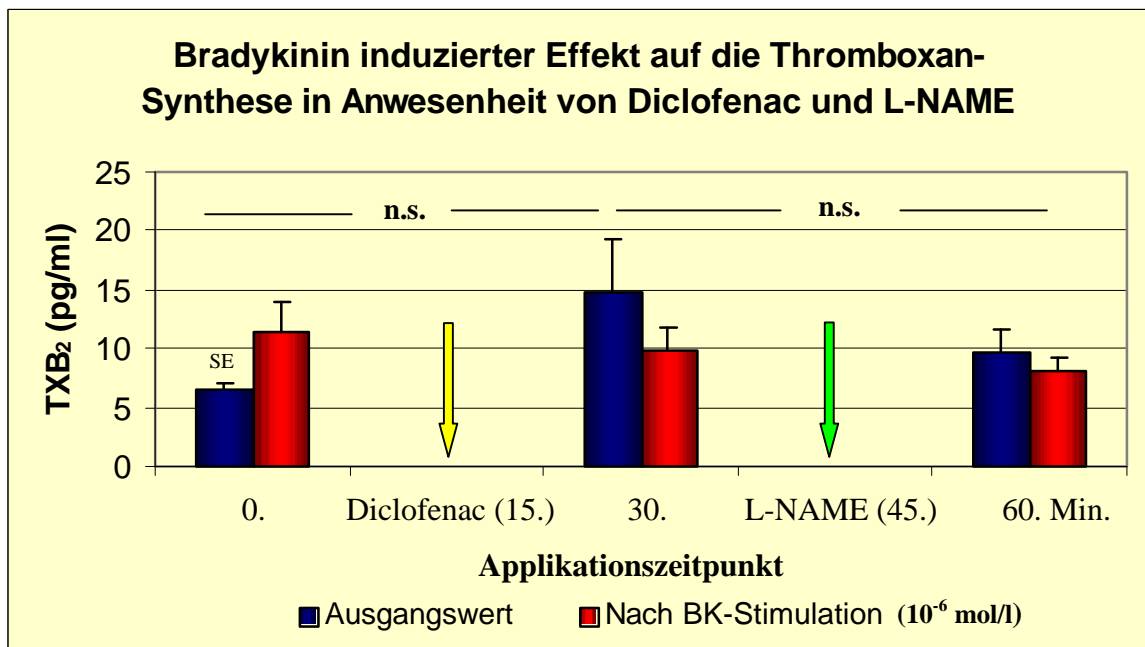
Die Abbildungen 3.23 und 3.24 geben einen zusammenfassenden Überblick.

Als wichtiges Resultat der vorliegenden Versuchsreihen gilt festzuhalten, daß die grundsätzliche vasoaktive Antwort auf eine Bradykinin-Bolusgabe ( $10^{-6} \text{ mol/l}$ ) – eine Vasokonstriktion mit einem Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks – unbeeinflusst von Cyclooxygenase- bzw. NO-Synthase-Hemmung auftrat.

Die genauen pathophysiologischen Hintergründe werden im Rahmen der sich anschließenden Diskussion näher erläutert. Hierbei soll – unter Berücksichtigung der hier beschriebenen Ergebnisse – insbesondere auch auf die vasoaktive Bedeutung der Arachidonsäuremetaboliten  $\text{PGI}_2$  und  $\text{TXA}_2$  in der isolierten und perfundierten Kaninchenlunge eingegangen werden.



**Abb. 3.23** Verhalten der PGI<sub>2</sub>-Synthese infolge Bradykinin-Stimulationen in Anwesenheit von Diclofenac und L-NAME [n=6].  
Die frühe Gabe des Cyclooxygenasehemmers verhindert signifikant jede Steigerung der PGI<sub>2</sub>-Ausschüttung. Im Verlauf kommt es zu keinen signifikanten Änderungen (n.s.) des stabilen Metaboliten 6-keto-PGF<sub>1α</sub> im Perfusat.



**Abb 3.24** Verhalten der TXA<sub>2</sub>-Synthese infolge Bradykinin-Stimulationen in Anwesenheit von Diclofenac und L-NAME [n=6].  
Auch hier verhindert Diclofenac im Verlauf signifikant (n.s.) ein Ansteigen des TXB<sub>2</sub> im Perfusat.  
Der scheinbare Anstieg des TXB<sub>2</sub> unter der Cyclooxygenase-Hemmung (hier zwischen der 15. und 30. Minute) wurde bereits im Text zur Versuchsreihe III erläutert und ist wohl Folge der intensiven Metabolitenproduktion aufgrund der Bradykinin-Bolusgabe in Minute 0.

### 3.3 GESAMTÜBERSICHT ÜBER DIE IN DIE STATISTISCHEN BERECHNUNGEN EINGEHENDEN MITTELWERTE NACH BRADYKININ-STIMULATION

VERSUCHSREIHE I (n = 6)				Im Perfusat (200 ml) vorliegende Endkonzentrationen:  Bradykinin: 2 * 10 <sup>-4</sup> mol/l → 10 <sup>-6</sup> mol/l L-Name: 2 * 10 <sup>-5</sup> mol/l → 10 <sup>-7</sup> mol/l Diclofenac: 10 µg/ml  Applikationen im 15-minütigen Abstand.								
Bradykinin												
Parameter	Basalwert	Spitzenwert	p									
PAP	6,88 ± 0,44	11,75 ± 0,72	<0,001									
6-keto-PGF <sub>1α</sub>	223,49 ± 29,83	259,82 ± 39,24	n.s.									
TXB <sub>2</sub>	7,31 ± 0,69	10,78 ± 1,89	=0,051									
VERSUCHSREIHE II (n = 6)												
Bradykinin				-	Bradykinin - L-NAME			-	Bradykinin			
Parameter	Basalwert	Spitzenwert	p	Basalwert	Spitzenwert	p	Basalwert	Spitzenwert	p	Basalwert	Spitzenwert	p
PAP	7,33 ± 1,07	12,16 ± 1,49	<0,05	7,41 ± 1,17	11,83 ± 1,52	<0,05	8,75 ± 1,86	18,66 ± 3,52	<0,05	10,50 ± 1,85	21,5 ± 3,03	<0,01
6-keto-PGF <sub>1α</sub>	205,2 ± 53,90	254,70 ± 55,2	n.s.	254,7 ± 55,20	275,1 ± 74,1	n.s.	292,3 ± 74,6	428,2 ± 85,2	n.s.	428,2 ± 85,2	542,2 ± 77,9	n.s.
TXB <sub>2</sub>	7,00 ± 1,10	11,83 ± 4,40	n.s.	11,83 ± 4,40	13,16 ± 4,30	n.s.	23,16 ± 6,10	38,16 ± 8,9	n.s.	38,16 ± 8,9	51,0 ± 16,7	n.s.
VERSUCHSREIHE III (n = 6)												
Bradykinin - L-NAME - Bradykinin - Diclofenac - Bradykinin												
Parameter	Basalwert	Spitzenwert	p	Basalwert	Spitzenwert	p	Basalwert	Spitzenwert	p			
PAP	6,40 ± 0,62	11,95 ± 2,20	<0,05	8,43 ± 1,03	19,25 ± 3,39	<0,05	7,23 ± 0,82	11,52 ± 1,46	<0,05			
6-keto-PGF <sub>1α</sub>	179,42 ± 49,2	198,10 ± 39,9	n.s.	237,45 ± 26,5	349,20 ± 59,1	<0,05	426,51 ± 57,2	370,34 ± 48,0	n.s.			
TXB <sub>2</sub>	9,00 ± 2,12	8,25 ± 1,4	n.s.	11,50 ± 4,1	22,25 ± 9,8	n.s.	35,25 ± 13,24	15,75 ± 6,5	n.s.			
VERSUCHSREIHE IV (n = 6)												
Bradykinin - Diclofenac - Bradykinin - L-NAME - Bradykinin												
Parameter	Basalwert	Spitzenwert	p	Basalwert	Spitzenwert	p	Basalwert	Spitzenwert	p			
PAP	6,66 ± 0,35	12,58 ± 1,00	<0,001	7,16 ± 0,38	12,33 ± 0,84	<0,001	7,25 ± 0,30	11,75 ± 0,61	<0,001			
6-keto-PGF <sub>1α</sub>	284,16 ± 45,23	302,89 ± 69,07	n.s.	320,80 ± 73,59	322,57 ± 61,53	n.s.	222,42 ± 35,45	246,64 ± 42,39	n.s.			
TXB <sub>2</sub>	6,5 ± 0,56	11,41 ± 2,60	= 0,059	19,66 ± 4,63	9,83 ± 1,95	n.s.	9,58 ± 1,98	8,0 ± 1,30	n.s.			

Tab. 3.1

Dargestellt sind im direkten Vergleich jeweils die PAP-Werte (arithmetisches Mittel mit Standardfehler [SE]) vor einer Bradykinin-Applikation (Basalwert) mit den PAP-Spitzenwerten (Spitzenwert) nach der Peptid-Stimulation. Außerdem zeigt die Tabelle die Werte für die durch Bradykinin induzierte Synthese der stabilen Metabolite TXB<sub>2</sub> und 6-keto-PGF<sub>1α</sub> (arithmetischer Mittelwert ± SE) jeweils vor bzw. 15 Minuten nach einer BK-Bolusgabe. Mit den beschriebenen Daten wurden die statistischen Berechnungen durchgeführt. **p** gibt jeweils die Signifikanz für die einzelnen Anstiege an. Werte von  $p > 0,05$  wurden als statistisch nicht signifikant (n.s.) angesehen. Weitere Erläuterungen im Text.

## 4 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Studie an der isolierten und perfundierten Kaninchenlunge war, die bisher nicht genau bekannten Interaktionen und pharmakologischen Wirkprinzipien des Bradykinins und seiner Autakoide in der Lungenstrombahn des Kaninchens weiter aufzuklären.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche zeigten, daß Bradykinin-Bolusapplikationen mit einer im Perfusatkreislauf vorliegenden Endkonzentration von  $10^{-6}$  mol/l in der pulmonalen Strombahn einen kurzzeitigen, hochsignifikanten Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks (PAP) hervorriefen. Der PAP fiel nach jeder Stimulation wieder in den Bereich des Ausgangsniveaus ab. Da bei allen Versuchsreihen ein konstanter Perfusionsflow beibehalten wurde, ist der aufgetretene PAP-Anstieg auf eine Erhöhung des vaskulären Gefäßtonus zurückzuführen.

Die Druckanstiege waren in 15-minütigem Abstand gut reproduzierbar. Die jeweils nahezu identischen Spitzendruckwerte des PAP nach den rezidivierenden Bradykinin-Bolusapplikationen weisen darauf hin, daß eine tachyphylaktisch bedingte Wirkungsabschwächung in der Beurteilung und Deutung der erhaltenen Versuchsergebnisse nicht berücksichtigt werden muß. Der gewählte Zeitraum zwischen zwei Bradykininapplikationen scheint in der Kaninchenlunge somit ausreichend zu sein, daß eine „down-regulation“ des  $B_2$ -Rezeptors in Form einer Internalisierung keine wesentliche Rolle spielt. Eine solche „down-regulation“ wurde erst in einer vor kurzem von PIZARD ET AL [149] veröffentlichten Arbeit für den menschlichen  $B_2$ -Rezeptor beschrieben. Aufgrund einer Wirkungsabschwächung bei dicht aufeinanderfolgenden, rezidivierenden Bradykinin-Stimulationen oder auch einer ver-

längerten Bradykinin-Verweildauer am Rezeptor durch beispielsweise ACE-Hemmer wurde ein solcher Effekt auch für die Kaninchenlunge vermutet [25].

Die Ergebnisse der Versuchsreihen der vorliegenden Studie zeigten weiterhin, daß die Hemmung der NO-Synthase mittels des kompetitiven cNOS-Inhibitors L-NAME den durch einen Bradykinin-Bolus induzierten PAP-Anstieg potenzieren konnte, diese Druckverstärkung wurde wiederum durch eine gleichzeitige Cyclooxygenase-hemmung verhindert.

In der nachfolgenden Diskussion soll die Bedeutung des NO in der Regulation einer Bradykinin-induzierten, vasoaktiven Reaktion im pulmonalen Gefäßbett erläutert und – unter Berücksichtigung von bisher aus der Literatur bekannten Resultaten – in einen Gesamtkontext gestellt werden.

Außerdem sollen die Wechselwirkungen des Bradykinins mit den beiden Arachidonsäuremetaboliten Thromboxan  $A_2$  sowie Prostazyklin und deren Anteil an der Druckreaktion näher beschrieben und interpretiert werden.

#### 4.1 AKTIVIERUNG DES ARACHIDONSÄURESYSTEMS

Im Perfusatmedium konnte 15 Minuten nach der Bradykinin-Bolusgabe, als Reaktion auf die Kinin-Substitution, ein signifikanter Anstieg des  $TXB_2$  im Vergleich mit den Ausgangswerten nachgewiesen werden. Eine signifikante Erhöhung für die Ausschüttung von  $PGI_2$  nach einer alleinigen Bradykinin-Applikation ergab sich allerdings nicht.

In der Literatur sind bisher wenig quantitative Bestimmungen der genannten Metaboliten nach Bradykinin-Stimulationen in den Lungengefäßen beschrieben worden.

Die Arbeiten, in denen diese laborchemischen Bestimmungen durchgeführt wurden, bieten zudem im Vergleich mit der vorliegenden Arbeit teilweise konträre Resultate. So konnten BREIL ET AL [25] unter nahezu identischen Versuchsbedingungen – ebenfalls an der isolierten Kaninchenlunge, gleiche Dosierung ( $10^{-6}$  mol/l) – 5 und 20 Minuten nach der Bradykinin-Applikation einen signifikanten 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub> -Anstieg nachweisen, wohingegen es allerdings zu keinem TXB<sub>2</sub>-Anstieg kam [25]. In anderen Arbeiten wurden an verschiedenen Spezies sowohl 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  als auch TXB<sub>2</sub>-Anstiege nach einer Kiningabe nachgewiesen [150, 163].

Die Ergebnisse können allerdings für Vergleiche zwischen den verschiedenen Arbeiten nicht vorbehaltlos herangezogen werden, da gezeigt werden konnte, daß die Ausschüttung der Arachidonsäuremetaboliten in der Lunge sowohl von der verwendeten Bradykinindosis als auch der untersuchten **Spezies** abhängig ist [8, 143].

Autoren weiterer experimenteller Arbeiten, die eine Beteiligung von PGI<sub>2</sub> bzw. TXA<sub>2</sub> an der Vermittlung des vaskulären Bradykinin-Effekts in der Lunge vermuteten, verzichteten auf laborchemische Bestimmungen der Metaboliten und wiesen eine mögliche Beteiligung nur indirekt über einen Cyclooxygenase-Hemmer oder durch Einsatz eines TXA<sub>2</sub>-Synthesehemmers nach [139, 169].

Bei der Diskussion über scheinbare Unterschiede im Syntheseverhalten von Arachidonsäuremetaboliten müssen auch meßtechnische Einflüsse, hier vor allem die verwendeten Nachweismethoden für die Metaboliten, berücksichtigt werden. In den oben zitierten Arbeiten [8, 25, 143, 150] kam jeweils ein Radioimmunassay (RIA) zur Anwendung, während in den Versuchsreihen der eigenen Studie die laborchemischen Bestimmungen mit Hilfe eines Enzymimmunoassays (ELISA) durchgeführt wurden. Da die *absolute* Menge des ausgeschütteten TXA<sub>2</sub> je nach

verwendeter Bradykinindosierung sehr niedrig ist, können die zu messenden TXB<sub>2</sub>-Spiegel – wie auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen – im unteren Nachweisbereich des jeweils verwendeten Testverfahrens liegen. Somit läßt sich die Schlußfolgerung ziehen, daß aufgrund der Streuung von Einzelwerten evtl. keine statistisch signifikanten Aussagen mehr möglich sind. Bei einem Vergleich bzw. einer Bewertung verschiedener Resultate sind daher auch vom biologischen System unabhängige Einflüsse mit zu berücksichtigen.

Echte Unterschiede in der Sensitivität zwischen den beiden Meßverfahren konnten allerdings nicht aufgezeigt werden [192].

Übereinstimmend mit den Resultaten der vorliegenden Studie kann – trotz der beschriebenen Unterschiede in Qualität und Quantität der ausgeschütteten Substanzen – allerdings festgehalten werden, daß Bradykinin in der Lungenstrombahn offensichtlich eine Aktivierung des Arachidonsäuresystems hervorruft [8, 25, 41, 127, 139, 150, 163].

Dies zeigte sich bei den eigenen Versuchen insbesondere in Anwesenheit des NO-Inhibitors L-NAME. Hier kam es bei den nachfolgenden Bradykinin-Applikationen zu signifikanten Anstiegen beider Arachidonsäure-Metaboliten im Vergleich mit den Ausgangswerten vor der NO-Synthasehemmung. Diesbezüglich existieren in der Literatur keine vergleichbaren Untersuchungen.

Auf die pathophysiologische Bedeutung dieser Tatsache wird in der Diskussion noch ausführlich eingegangen.

#### 4.2 BRADYKININ INDUZIERTE DRUCKREAKTIONEN IN DER PULMONALEN STROMBAHN

Der Bradykinin-Effekt im Gefäßbett der isolierten Kaninchenlunge verhält sich konträr zu den Kinin-induzierten Gefäßwirkungen in der systemischen oder vor allem auch der koronaren Zirkulation, in denen das Peptid über NO und PGI<sub>2</sub> eine entscheidende relaxierende bzw. vasodilatatorische Funktion ausübt. Die beiden Autakoide müssen demnach in der (Kaninchen-) Lungenstrombahn eine andere Bedeutung haben als im übrigen Kreislauf.

Vergleicht man zunächst die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den experimentellen Resultaten anderer Autoren an isolierten Lungenmodellen, so fällt auf, daß auch die beschriebenen *pulmonalen* Gefäßreaktionen auf Bradykinin kontrovers beschrieben werden. Darüber hinaus sind Untersuchungen an der *Kaninchenlunge* mit vergleichbaren Fragestellungen in der Literatur bisher nur vereinzelt beschrieben.

Die bisher publizierten Reaktionen des pulmonalarteriellen Drucks auf Bradykinin-Stimulationen variieren zwischen Vasodilatation [65, 117, 162], Vasokonstriktion [25, 139, 169] bzw. überhaupt keiner Reaktion auf eine Kininapplikation [18, 19, 45].

Trotz teilweise völlig gegensätzlich erscheinender Resultate muß allerdings für eine Bewertung bzw. Interpretation der jeweiligen Versuchsergebnisse zum einen die in den verschiedenen Arbeiten verwendete genaue Versuchsmethodik, zum anderen vor allem die Spezies berücksichtigt werden, an denen die Versuche durchgeführt wurden. Auch die verwendeten Bradykinin-Dosierungen spielt eine wichtige Rolle.



Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit erhielten auch SEEGER ET AL [169] sowie BREIL ET AL [25] unter vergleichbaren Versuchsbedingungen einen PAP-Anstieg nach Bradykinin-Bolusgaben an der isolierten Kaninchenlunge. BREIL ET AL verwendeten eine zu den vorliegenden Versuchsreihen identische Bradykinin-Endkonzentration im Perfusat, wohingegen die Bradykinin-Dosierungen in der Arbeit von SEEGER ET AL höher lagen. Beide Arbeitsgruppen beschrieben einen reversiblen PAP-Anstieg in der Lungenstrombahn nach der Bradykinin-Applikation.

Ebenfalls einen PAP-Anstieg als Reaktion auf eine Bradykinin-Gabe – bei konstantem Perfusionsflow – beschrieben auch NOSSAMAN ET AL [139], LAL ET AL [109], BAKER ET AL [6] sowie RYRFELDT ET AL 1990 [161], dies allerdings jeweils am Modell der isolierten und perfundierten Rattenlunge.

Vom methodischen Ansatz, Fragestellung und Versuchsaufbau nahezu identisch mit den Versuchen an der isolierten Kaninchenlunge waren insbesondere die Arbeiten von NOSSAMAN ET AL [139]. Als Perfusatmedium für die Rattenlunge wurde allerdings von den genannten Autoren ein Gemisch aus Blut und Krebs-Henseleit-Lösung verwendet. Auch hier kam es jeweils zu einem dosisabhängigen Anstieg des PAP auf Bradykinin. Daß die Zunahme des Gefäßwiderstands wirklich Folge einer Bradykinin-Stimulation war, konnte experimentell durch Gabe des B<sub>2</sub>-Rezeptorblockers HOE 140 gezeigt werden. In diesem Fall waren keine Druckreaktionen nach Bradykinin-Gabe mehr meßbar.

Auch in der eigenen Arbeit an der isoliert Kaninchenlunge kam es – vergleichbar mit den Arbeiten von NOSSAMN ET AL – zu einem dosisabhängigen Anstieg des PAP. Dies zeigten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Dosisfindungsversuche.

Die in den Versuchsreihen verwendete Bradykinin-Dosierung von  $10^{-6}$  mol/l liegt deutlich über physiologischerweise auftretenden Bradykininkonzentrationen im Herz-Kreislaufsystem. Daher soll zunächst – vor einer Diskussion der verschiedenen Mechanismen, die für den Gefäßwiderstandsanstieg verantwortlich sind – auf die zugrunde liegenden pathophysiologischen Vorstellungen, aufgrund derer eine solche hohe Bradykinin-Dosierung gewählt wurde, näher eingegangen werden.

#### 4.2.1 LOKALE BRADYKININ-AKKUMULATION UNTER ACE-HEMMERN

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, mögliche pathophysiologischen und pharmakologischen Wirkungen des Bradykinins in der pulmonalen Strombahn des Kaninchens zu untersuchen. Daß dies eine Frage von wichtiger klinisch-therapeutischer Bedeutung ist, ist nicht zuletzt auf die Wirkungsweise der seit Jahren sehr häufig verwendeten ACE-Hemmer in der antihypertensiven und KHK-Therapie zurückzuführen.

Da das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) identisch mit der Kininase II ist [51], kommt es bei einer ACE-Hemmung zugleich zu einer Verzögerung des Bradykinin-Abbaus und damit zu einer Kumulation von endogenen Kininen mit einer bis zu dreifach verlängerten hämodynamischen *Wirkdauer* [22]. Damit wird zugleich auch der *Wirkungseffekt* der Kinine vervielfacht. Diese Wirkungsverlängerung der Kinine scheint – neben der gleichzeitigen Hemmung des Renin-Angiotensin-Systems – über eine vermehrte Freisetzung von NO, PGI<sub>2</sub> sowie EDHF maßgeblich zu den ACE-Hemmer-induzierten vasodilatativen bzw. relaxierenden Effekten beizutragen. Dieser Effekt ist offensichtlich vor allem in der koronaren Zirkulation von wesentlicher Bedeutung [5, 20, 22, 25, 82, 128].

Geht man zunächst von den Wirkungen der ACE-Hemmer in der *systemischen* Zirkulation aus, so beschreibt BÖNNER 1994 in seiner Übersichtsarbeit [16], daß eine „gefährliche“ Kumulation von Kininen im Blut durch nicht gehemmte Kininasen verhindert wird. Hier ist insbesondere die Kininase I zu nennen [16], über die das des-Arg<sup>9</sup>-Bradykinin entsteht. Berücksichtigt man diese physiologischen Zusammenhänge, so ist es fraglich, ob aus der *systemischen* Zirkulation unter einer ACE-Hemmer-Therapie relevante Mengen an Bradykinin in die Lungenstrombahn gelangen, die ausreichen würden, eine vasoaktive Reaktion beispielsweise im Sinne einer Vasokonstriktion und eines daraus folgenden Druckanstiegs auszulösen. Die zudem hohe Abbaukapazität der Lunge für Bradykinin [7, 160] läßt dies unwahrscheinlich erscheinen. Auf die Schwierigkeiten, im peripheren Blut Bradykininspiegel zu messen, wiesen in diesem Zusammenhang mehrere Autoren hin [17, 138].

Die vorliegenden Versuchsreihen wurden allerdings unter der Vorstellung einer verstärkten *lokalen* Bradykinin-Wirkung durchgeführt.

Entscheidend für die Wahl einer unphysiologisch hohen Bradykinin-Dosierung am isolierten Lungenmodell waren die in verschiedenen experimentellen Versuchsreihen gewonnenen Erkenntnisse, daß ACE-Hemmer neben einer systemischen Hemmung vor allem die **lokale Konzentration** von Bradykinin in bzw. an der Gefäßwand erhöhen. Dieser ACE-Hemmer-induzierte Effekt wurde in Übersichtsarbeiten von LUSCHER [118] sowie MOMBOULI UND VANHOUTTE [128] zusammenfassend dargestellt. Auch weitere Autoren beschrieben diesen pathophysiologischen Zusammenhang. Laborchemisch konnte die lokale Bradykinin-Kumulation indirekt über eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den vaskulären Endothelzellen nachgewiesen werden [29, 82, 83, 84]. GOHLKE ET AL [72] beschrieben

darüber hinaus eine Bradykinin-Akkumulation nach ACE-Hemmung auch für tiefere (muskuläre) Schichten der Gefäßwand.

Eine der physiologischen Erklärungen für die Akkumulation von Bradykinin unter ACE-Hemmern könnten lokale Kallikrein-Kinin-Systeme in der Gefäßwand sein, die über eine Aktivierung von HMW-Molekülen zu einer autokrinen- bzw. parakrinen Autakoidfreisetzung – respektive Bradykinin – führen. Untersuchungen, die dies bestätigen, sind in der Arbeit von LINZ UND SCHÖLKENS [115] zusammengefaßt, auch andere Autoren unterstützen mit den Ergebnissen ihrer experimentellen Arbeiten diese Vorstellung [74, 116, 195]. Unter anderem konnte der beschriebene physiologische Mechanismus auch in den *koronaren* Endothelzellen des Kaninchenorganismus nachgewiesen werden [85].

Berücksichtigt man diese physiologischen Zusammenhänge, so ist die gewählte Bradykinin-Dosierung in den vorliegenden Versuchsreihen durchaus gerechtfertigt, da es unter den genannten Voraussetzungen zu hohen lokalen Bradykinin-Konzentrationen auch in der Lungenstrombahn kommen kann.

Die pharmakologische Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l sollte die beschriebene Bradykinin-Akkumulation simulieren, um deren Auswirkungen im pulmonalen Gefäßbett untersuchen zu können.

#### 4.2.2 ROLLE DER APPLIKATIONSGESCHWINDIGKEIT

Um die genannten lokalen Konzentrationen zu erreichen, mußte für die Applikation des Bradykinins eine hohe Injektionsgeschwindigkeit gewählt werden, da ein verzögertes Anfluten des Peptids in der Lungenstrombahn nicht den gewünschten Effekt erzielt hätte.

Bei einer in der vorliegenden Studie angewendeten Applikationsgeschwindigkeit des Kinin-Bolus von 1ml / 0,5 Sekunden ergibt sich beim Eintritt in die Lungenstrombahn rechnerisch eine lokale Bradykinin-Konzentration von ca.  $10^{-4}$  mol/l (Perfusat-flow 200 ml/min).

Bezüglich der Applikationsgeschwindigkeit sind speziell für das Bradykinin in der Literatur keine direkt vergleichenden Untersuchungen beschrieben. Allerdings wurden für einen anderen Vasokonstriktor, das Endothelin-1 (ET-1), im pulmonalen Gefäßbett der Schafslunge von der jeweiligen Infusionsgeschwindigkeit abhängige Effekte festgestellt. Zu einer starken Kontraktion der pulmonalen Gefäße kam es vor allem dann, wenn das Peptid im Bolus innerhalb einer Sekunde gespritzt wurde. Wurde die gleiche Dosierung über 10 bzw. 180 Sekunden appliziert, war die vaso-konstriktive Reaktion deutlich abgeschwächt bzw. trat nicht mehr auf [54]. Auch die Höhe der Ausschüttung der die ET-1-Wirkung vermittelnden Mediatoren (Thromboxan  $A_2$  sowie 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ ) hing stark von der Injektionsgeschwindigkeit ab [54]. Ob dies in dieser Form auch auf Bradykinin-Applikationen zutrifft, müßte näher untersucht werden. Hierin könnte zugleich eine Erklärung für scheinbar nicht übereinstimmende Gefäßreaktionen zwischen verschiedenen Arbeiten liegen.

Nachfolgend soll auf die verschiedenen möglichen Mechanismen und Mediatoren eingegangen werden, auf die die pulmonalarterielle Drucksteigerung in der isolierten Kaninchenlunge nach einer Bradykinin-Bolusapplikation zurückzuführen ist.

### 4.3 ROLLE DES THROMBOXAN A<sub>2</sub> AM PAP-ANSTIEG BEI ALLEINIGER BRADYKININ-APPLIKATION

Daß Thromboxan A<sub>2</sub> prinzipiell in der Lage ist, den pulmonalarteriellen Druck über eine Erhöhung des Gefäßwiderstandes anzuheben, konnten KADOWITZ UND HYMAN [101] bereits 1980 an der Katzen- sowie Hundelunge zeigen.

In den Untersuchungen von SEEGER ET AL [169] konnte sowohl durch den Cyclooxygenasehemmer Indomethacin als auch durch den Thromboxan-Synthasehemmer Imidazol der PAP-Anstieg deutlich reduziert werden. Daher schien TXA<sub>2</sub> unmittelbar an der Vermittlung der Bradykinin induzierten Druckerhöhung beteiligt. Die Autoren führten allerdings keine quantitativen Bestimmungen des Metaboliten durch. Kontrovers hierzu hatte allerdings der in den Versuchsreihen der vorliegenden Arbeit verwendete Cyclooxygenasehemmer Diclofenac keinen Einfluß auf die Intensität der PAP-Reaktion nach einem Bradykinin-Bolus.

Daß durch Diclofenac bei einer erneuten Bradykinin-Stimulation eine Thromboxan A<sub>2</sub>-Produktion signifikant verhindert wurde, konnte durch laborchemische Bestimmungen des stabilen Metaboliten TXB<sub>2</sub> gezeigt werden. Dennoch kam es zu einem unveränderten Anstieg des PAP. Aufgrund der eigenen Ergebnisse scheint die erhöhte TXA<sub>2</sub>-Ausschüttung in den vorliegenden Versuchen **nicht** für die Bradykinin-induzierte Drucksteigerung in der pulmonalen Strombahn verantwortlich zu sein.

Die Unterschiede zu der Arbeit von SEEGER ET AL scheinen zunächst unklar, lassen sich aber unter Einbeziehung der Ergebnisse von BAKER ET AL [6, 7] an der isolierten Rattenlunge interpretieren. Beide Arbeitsgruppen verwendeten in ihren Arbeiten zur Stimulation höhere Bradykinin-Dosierungen als in der vorliegenden Studie. Bei BAKER ET AL schützte im Perfusat vorhandene Acetylsalicylsäure die Lunge vor einem andernfalls irreversiblen Druckanstieg des PAP [6]. Auch in diesem Fall wurden allerdings quantitative Bestimmungen des Thromboxan A<sub>2</sub> nicht

durchgeführt, so daß nur indirekte Rückschlüsse auf die Funktion der Arachidonsäuremetaboliten gezogen werden konnten.

Auf die dosisabhängige Ausschüttung des TXA<sub>2</sub> infolge von Bradykinin-Stimulationen wurde oben bereits hingewiesen [8, 163]. Die in der vorliegenden Versuchsreihe in der isolierten Kaninchenlunge nach dem Kinin-Stimulus synthetisierte *absolute* TXA<sub>2</sub>-Menge ist mit  $10,78 \pm 1,89$  pg/ml (n=24) sehr niedrig.

Aufgrund der genannten Resultate scheint daher die Vermutung gerechtfertigt, daß TXA<sub>2</sub> erst ab bestimmten Konzentrationen zur Vermittlung eines Bradykinin-induzierten PAP-Anstiegs beiträgt. Die hierfür notwendigen TXA<sub>2</sub>-Mengen werden bei einer Endkonzentration von  $10^{-6}$  mol/l offensichtlich nicht erreicht.

Anders sind allerdings die pathophysiologischen Zusammenhänge und der Effekt des Thromboxan A<sub>2</sub>, wenn weitere Einflüsse auf das Lungenmodell bzw. die Gefäßstrombahn einwirken, in der vorliegenden Arbeit in Form einer NO-Synthasehemmung durch L-NAME. Hierauf soll im Rahmen dieser Diskussion noch separat eingegangen werden.

Kontrovers zu den hier geschilderten Zusammenhängen zur TXA<sub>2</sub>-Wirkung im pulmonalen Kreislauf beschrieben NOSSAMAN ET AL [139] an der Rattenlunge eine *Wirkungsverstärkung* des Bradykinin-induzierten Druckanstiegs in Anwesenheit des Cyclooxygenasehemmers Meclofenamat. Die pathophysiologischen Ursachen dieser divergierenden Reaktionen sind unklar und könnten auf spezies- bzw. Untersuchungsmodell-spezifische Einflüsse zurückgeführt werden.

#### 4.4 BEDEUTUNG DES *DIREKTEN* BRADYKININ-EFFEKTS AUF DIE GLATTE GEFÄßMUKULATUR FÜR DEN PAP-ANSTIEG

Da in der vorliegenden Arbeit der Anstieg des Gefäßwiderstandes in der Kaninchenlunge nicht über den TXA<sub>2</sub>-Anstieg erklärbar ist, müssen andere Mechanismen für den pulmonalarteriellen Druckanstieg verantwortlich sein.

Hierzu sind die physiologischen Wirkungen des Bradykinins auf unterschiedliche Schichten bzw. Gewebearten der Gefäßwand zu berücksichtigen.

Bei einer Reihe von Mediatoren sind die direkten und Endothel-vermittelten Wirkungen entgegengesetzt. Dies gilt beispielsweise für Substanzen wie Acetylcholin, Angiotensin II als auch insbesondere für das Bradykinin (siehe Abb. 1.3, Abschnitt 1). Die direkte, *konstriktorische* Wirkung des Kinins an der glatten Muskulatur [2, 9, 108, 152, 183] wird unter physiologischen Bedingungen maskiert, da zum einen die Endothel-vermittelte Ausschüttung *vasodilatierender* Mediatoren überwiegt und zum anderen die hohe Abbaukapazität der Kininase II die in der pulmonalen Strombahn zirkulierenden Kinine sehr schnell abbaut.

Basierend auf diesen physiologischen Grundlagen wäre daher vorstellbar, daß bei den in den Versuchsreihen angewendeten pharmakologischen Bradykinin-Konzentrationen die direkte, konstriktorische Wirkung den vasodilatierenden Effekt der Metaboliten NO und PGI<sub>2</sub> dominiert und in der Bilanz somit eine Zunahme der Gefäßresistenz bzw. ein PAP-Anstieg resultiert. Ein solch dosisabhängiger Mechanismus mit direkten und indirekten Bradykinin-induzierten Effekten wird in neueren Arbeiten auch für andere Gefäß- bzw. Organregionen verschiedener Spezies beschrieben [122, 146, 189].



#### 4.5 MÖGLICHE BEDEUTUNG WEITERER ARACHIDONSÄUREMETABOLITEN AM PAP-ANSTIEG

Wie oben bereits beschrieben, wird durch Bradykinin in der Lungenstrombahn des Arachidonsäuresystems aktiviert. Daher kann man vermuten, daß neben  $\text{TXA}_2$  und  $\text{PGI}_2$  evtl. auch weitere Arachidonsäure-Abkömmlinge zu dem Bradykinin-induzierten Druckanstieg beitragen. Auf die diesbezüglich möglicherweise relevanten – und in der Literatur beschriebenen – Arachidonsäuremetaboliten Leukotrien  $\text{D}_4$  und  $\text{PGD}_2$  soll kurz eingegangen werden.

LACH ET AL [108] konnten 1994 an isolierten Lungenparenchymstreifen des Meerschweinchens eine Verstärkung der Kontraktion der glatten Muskulatur mittels eines ACE-Hemmers nachweisen. Diese – dosisabhängige – kontraktile Antwort war zum einen durch den Cyclooxygenasehemmer Indomethacin als auch durch den Thromboxan  $\text{A}_2$ -Synthase Inhibitor Furegrelat signifikant abschwächbar, allerdings konnte auch der 5-Lipoxygenase-Inhibitor AA-861 die Bradykinin-induzierte Reaktion abschwächen [108]. Für das 5-Lipoxygenaseprodukt Leukotrien  $\text{D}_4$  konnten FARRUKH ET AL [56] in der pulmonalen Strombahn des Kaninchen eine dosisabhängige konstriktive Wirkung auf die Gefäßmuskulatur nachweisen. Nach den Untersuchungsergebnissen dieser Autoren wird der  $\text{LTD}_4$ -induzierte Anstieg der pulmonalarteriellen Gefäßresistenz über  $\text{TXA}_2$  vermittelt.

Auch in den Lungengefäßen anderer Spezies haben Leukotriene eine vasokonstriktorische Wirkung, wie von KADOWITZ ET AL [100] gezeigt werden konnte. Ob Leukotrien  $\text{D}_4$  bei den vorliegenden Versuchsreihen an der isolierten Kaninchenlunge mit an der Wirkungsvermittlung des Bradykinins beteiligt ist, läßt sich aufgrund der gewählten Versuchsmethodik und den vorliegenden Resultate nicht mit hinreichender Sicherheit beantworten.

Aufgrund seiner Wirkungscharakteristik kommt für die Steigerung der pulmonalen Gefäßresistenz auch das Prostaglandinderivat  $\text{PGD}_2$  in Frage, das in der Lungenstrombahn verschiedener Tierspezies ebenfalls eine vasokonstriktorische Wirkung entfaltet [70, 106]. KING ET AL [106] vermuteten 1991 aufgrund von Untersuchungen in der Gefäßstrombahn der Schafslunge, daß möglicherweise über  $\text{PGD}_2$  pulmonale Gefäßprozesse vermittelt werden, die man vorher alleine dem Thromboxan  $\text{A}_2$  zugeschrieben hatte. Auch hierbei ist unklar, inwiefern diese Ergebnisse auf anderer Tierspezies, speziell auch auf die Kaninchenlunge übertragbar sind. Zumindest scheint  $\text{PGD}_2$  bei einer verwendeten Bradykinin-Konzentration von  $10^{-6}$  mol/l keinen maßgeblichen Anteil an der Erhöhung der Gefäßresistenz zu haben, da sich unter Cyclooxygenasehemmung das Druckverhalten nicht ändert. Die  $\text{PGD}_2$ -Synthese müßte aber aufgrund des Angriffsorts des Diclofenac im Arachidonsäuresystem, genau wie die  $\text{TXA}_2$ -Produktion, gehemmt werden.

Darüber hinaus lassen sich aufgrund der im Rahmen dieser experimentellen Arbeit erhobenen Daten keine weiteren Aussagen hinsichtlich einer möglichen Funktion des  $\text{PGD}_2$  im pulmonalen Gefäßbett der Kaninchenlunge machen.

#### 4.6 VERGLEICH BRADYKININ-INDUZierter EFFEKTE ZWISCHEN PULMONALEN ARTERIEN UND VENEN

REGOLI UND BARABÉ [152] beschrieben 1980 in ihrer Übersichtsarbeit den Effekt von Bradykinin auf Blutgefäße verschiedener Spezies getrennt nach der Wirkung in Arterie und Vene. Bezogen auf die Pulmonalgefäße zeigte sich, daß in der Hunde- und Katzenlunge die Bradykinin-Dosierung, die erforderlich war, um in den venösen Gefäßabschnitten einen vasoaktiven Effekt hervorzurufen, um ein bis zwei 10er-Potenzen niedriger lag, als in den vergleichbaren arteriellen Abschnitten. Speziell für die Kaninchenlunge wurden solche Vergleich allerdings nicht angestellt.

Ein Problem hinsichtlich der Beurteilung von Kinin-induzierten Effekten im pulmonalen Gefäßbett stellt die Tatsache dar, daß bisher die genaue *Verteilung* der Bradykinin ( $B_2$ ) - Rezeptoren in der (Kaninchen-) Lungenstrombahn nicht untersucht wurde.

Die Ergebnisse von KEMP ET AL [105] an isolierten Gefäßen der Schafslunge deuten darauf hin, daß die Reaktionen auf eine Bradykinin-Stimulation nicht nur vom Gefäßtyp (d.h. Arterie oder Vene) sondern auch von dem jeweiligen Gefäßdurchmesser abhängig sind. KEMP ET AL vermuteten, daß eine solche Spezialisierung eine wesentliche Bedeutung für die Widerstandsregulation in dem pulmonalen Niederstromgebiet haben könnte.

Ergänzend ist an dieser Stelle anzumerken, daß in neueren Arbeiten auch Unterschiede hinsichtlich der Ausschüttung bzw. der modulatorischen Funktion der Bradykinin-Autakoide NO und  $PGI_2$  zwischen pulmonalen Arterien und Venen diskutiert werden [57, 68, 162].

Aufgrund der in dieser Arbeit verwendeten hohen Bradykinin-Dosen läßt sich unter Berücksichtigung der oben bereits vorgestellten Daten von REGOLI UND BARABÉ

[152] vermuten, daß in den *venösen* Gefäßabschnitten der isolierten Kaninchenlunge noch Bradykinin-Konzentrationen ankommen, die ausreichen, eine Vasokonstriktion hervorzurufen. Diese Reaktion könnte daher zu der gemessenen PAP-Steigerung beitragen. Eine genaue Differenzierung ist diesbezüglich aufgrund der verwendeten Meßmethodik, die ja die *pulmonalarteriellen* Gefäßwiderstandsänderungen widerspiegelt, nicht möglich, könnte aber Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

#### 4.7 ROLLE DES PGI<sub>2</sub> IN DER PULMONALEN GEFÄßSTROMBAHN

Im pulmonalen Gefäßbett der Kaninchenlunge kommt es in Folge der Bradykinin-Bolusapplikation zu einer Freisetzung von PGI<sub>2</sub>, signifikant ist diese Steigerung aber erst bei gleichzeitiger NO-Synthasehemmung durch L-NAME.

KADOWITZ ET AL [98] konnten bereits 1978 mittels in die Lungengefäße appliziertem PGI<sub>2</sub> zeigen, daß der Arachidonsäuremetabolit prinzipiell in der Lage ist, in der pulmonalarteriellen Strombahn den PAP dosisabhängig zu senken.

Im Gegensatz zu der im systemischen Kreislauf beschriebenen Vermittlung einer Bradykinin-induzierten *gefäßrelaxierenden* Wirkung scheint PGI<sub>2</sub> in der pulmonalen Strombahn der isolierten Kaninchenlunge **keine** entscheidende vasoaktive Funktion zu vermitteln. Diese Schlußfolgerung wird durch die Ergebnisse der Versuchsreihen gestützt, in denen der Cyclooxygenasehemmer Diclofenac zur Anwendung kam.

In Anwesenheit von Diclofenac kommt es, laborchemisch nachgewiesen über einen fehlenden Anstieg des 6-keto-PGF<sub>1α</sub> im Perfusatmedium, zu keiner vermehrten Prostazyklinproduktion in Reaktion auf den Bradykinin-Bolus. Ein potentieller

Vasodilatator ist somit gehemmt. Hinsichtlich der pulmonalarteriellen Druckantwort kommt es im Vergleich mit der Druckreaktion in der Kontrollgruppe aber zu keiner signifikanten Änderung des PAP-Anstieges, insbesondere zeigt sich auch keine Erhöhung des Gefäßwiderstandes. Eine weitere Bestätigung der oben genannten Hypothese ergibt sich bei gleichzeitiger Anwendung eines NO-Synthasehemmers. Obwohl es nach L-NAME-Gabe und der anschließenden Bradykinin-Applikation zu einer signifikanten Erhöhung der PGI<sub>2</sub>-Freisetzung kam, reagierte die Lunge dennoch mit einem deutlich verstärkten PAP-Anstieg nach der erneuten Peptid-Gabe.

Vergleichbar mit der bereits diskutierten, dosisabhängigen TXA<sub>2</sub>-Ausschüttung auf Kinin-Applikationen ist bei Verwendung höherer Bradykinin-Konzentrationen auch eine vermehrte PGI<sub>2</sub>-Produktion zu vermuten. Ob der Metabolit in diesem Fall eine relevante vasoaktive, relaxierende Wirkung entfalten würde, kann durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht beurteilt werden.

In der Literatur sind bisher keine gesicherten Daten bezüglich der genauen Bedeutung einer Bradykinin-induzierten PGI<sub>2</sub>-Freisetzung in der Lungenstrombahn beschrieben. Vergleichende Untersuchungen sind schwierig, da die *Spezifität* der ausgeschütteten Arachidonsäure-Metaboliten speziesabhängig ist [8, 75, 163].

Einige experimentelle Arbeiten an verschiedenen Spezies deuten – konträr zu den vorliegenden Resultaten – darauf hin, daß PGI<sub>2</sub> eine *vasodilatative* Gefäßantwort infolge einer Bradykininstimulation vermittelt [65, 67, 117, 162]. Diese divergierenden Ergebnisse können mit – in ihrer Wertigkeit derzeit nicht sicher zu beurteilenden – Einflüssen wie z.B. Spezies, verwendete Bradykinin-Dosierung,

Versuchsmethodik oder unterschiedlichem Ausgangstonus der pulmonalen Gefäße erklärt werden.

In den zuletzt zitierten Arbeiten wurde neben der  $\text{PGI}_2$ -Funktion auch die Rolle des zweiten Vasodilators NO durch Einsatz von NO-Synthasehemmern untersucht. Hier deuten die Ergebnisse übereinstimmend darauf hin, daß  $\text{PGI}_2$  – im Vergleich mit NO – zumindest eine eher untergeordnete Rolle bei der Vermittlung von Bradykinin-induzierten Effekten im pulmonalen Gefäßbett spielt. GAMBONE ET AL [67] vermuteten darüber hinaus auch in der Lunge eine Beteiligung des Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) als dritten Mediator der Vasodilatation neben  $\text{PGI}_2$  und NO.

KADOWITZ ET AL [99] konnten an anästhesierten Katzen und Hunden zeigen, daß  $\text{PGI}_2$  insbesondere dann eine verstärkte vasodilatatorische Potenz entwickelt, wenn der pulmonale Gefäßtonus zuvor aktiv angehoben wurde. Vergleichbare Resultate erhielten diesbezüglich auch VOELKEL ET AL an der Ratte [186].

Aufgrund dieser Untersuchungsdaten läßt sich folgern, daß Prostazyklin weniger bei kurzzeitigen Druckspitzen, sondern vor allem bei einer dauerhaften Gefäßwiderstandserhöhung wie beispielsweise einer chronisch hypoxisch veränderten Lungenstrombahn relaxierend wirkt.

Diese Erkenntnisse aus tierexperimentellen Untersuchungen werden u.a. in der klinische Therapie der pulmonalen Hypertension angewendet bzw. sind nach wie vor noch Gegenstand klinischer Forschung. Für die Lunge ist u.a. exogen appliziertes  $\text{PGI}_2$  für die Behandlung dieser Erkrankung von Bedeutung. Neben der intravenösen Anwendung sind zwecks Reduzierung von unerwünschten systemischen Wirkungen auch inhalierbare Applikationsformen von  $\text{PGI}_2$  in klinischer Erprobung [46, 73, 124].

#### 4.8 ROLLE VON NO UND SEINE INTERAKTIONEN MIT TXA<sub>2</sub>

Da aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wichtige Interaktionen zwischen den beiden Bradykinin-Autakoiden NO und TXA<sub>2</sub> anzunehmen sind, soll die Funktion der Metaboliten in der pulmonalen Gefäßstrombahn gemeinsam diskutiert werden.

In Anwesenheit eines NO-Synthasehemmers führten die folgenden Bradykinin-Injektionen zu einer signifikanten Potenzierung der pulmonalarteriellen Druckreaktion (Versuchsreihe II).

Laborchemisch konnte zudem nachgewiesen werden, daß es in Anwesenheit von L-NAME infolge eines Kinin-Bolus zu einer signifikant vermehrten TXA<sub>2</sub>-Ausschüttung im Vergleich mit der Kontrollgruppe kam.

Aus den beschriebenen Ergebnissen läßt sich zunächst ableiten, daß NO bei den Kontrollversuchen eine den Bradykinin-induzierten Druckanstieg *limitierende* Wirkung einnehmen muß. Dieser NO-Effekt ist allerdings aufgrund der in den Versuchsreihen erhobenen Datenlage *nicht direkt* auf eine relaxierende Wirkung des Stickstoffmonoxids auf die glatte Gefäßmuskulatur zurückzuführen. Vielmehr scheint der entscheidende pathophysiologische Mechanismus eine **Interaktion zwischen NO und TXA<sub>2</sub>** zu sein. Dies soll im folgenden näher erläutert werden.

Vergleicht man das Ausmaß der PAP-Reaktion auf Bradykinin-Gaben bei *gleichzeitiger* Anwesenheit von Diclofenac und L-NAME im Perfusatkreislauf, so verhindert der Cyclooxygenasehemmer trotz *vorheriger* NO-Synthasehemmung durch L-NAME vollständig eine Potenzierung des Druckanstiegs. Im Perfusat kommt es zu keinem TXB<sub>2</sub>-Anstieg (Versuchsreihe III).

Ergänzend sollen noch die Ergebnisse der Versuchsreihe IV herangezogen werden, hier wurde zwischen den intermittierenden Bradykinin-Applikationen *erst* Diclofenac zur Blockierung des Cyclooxygenasewegs und *dann* L-NAME zwecks NO-Inhibition gegeben. Die im Rahmen dieser gewählten Synthesehemmer-Reihenfolge durchgeführten Druckmessungen zeigten, daß sich eine fehlende NO-Produktion in diesem Fall nicht mehr auf die Bradykinin-induzierten Veränderungen der pulmonalarteriellen Gefäßresistenz auswirkten. Es kam zu einem Druckanstieg, der im Vergleich mit der PAP-Reaktion der zu Beginn der Versuchsreihen – aus Kontrollzwecken ohne Cyclooxygenase- bzw. NO-Hemmung – durchgeführten Kinin-Stimulation keine signifikanten Unterschiede aufwies.

Wäre die NO-Ausschüttung der entscheidende Faktor für die Potenzierung des PAP, hätte man trotz Cyclooxygenasehemmung eine Verstärkung der PAP-Reaktion erwarten können. Diese blieb allerdings aus.

Somit kann nur ein Cyclooxygenaseprodukt der Arachidonsäure für die Verstärkung der pulmonalarteriellen Druckantwort bei gleichzeitiger NO-Hemmung verantwortlich sein. In erster Linie muß hier – unter Berücksichtigung seiner vaso-konstriktorischen Potenz – an das in deutlich erhöhten Mengen im Perfusat nachgewiesene Thromboxan A<sub>2</sub> gedacht werden.

Daß eine Druckverstärkung nur deshalb nicht stattfand, weil keine ausreichende NO-Synthase-Hemmung mehr gewährleistet war, kann aufgrund der Ergebnisse der Versuchsreihe II ausgeschlossen werden. Eine Bradykinin-Stimulation ebenfalls 30 Minuten nach L-NAME-Gabe in das Perfusionssystem erzeugte eine signifikante Verstärkung des PAP-Anstiegs im Vergleich mit der Kontroll-Applikation.



Basierend auf diesen Ergebnissen hat NO in der pulmonalen Strombahn der isolierten Kaninchenlunge eine andere Bedeutung als in der kardiovaskulären Zirkulation. NO wirkt bei Bradykinin-Boli in die Lungenstrombahn nicht über eine Endothel-vermittelte Wirkung relaxierend auf die Gefäßmuskulatur. Vielmehr scheint das Stickstoffmonoxid *indirekt* über eine Regulation des an der glatten Muskelzelle kontraktorisch wirkenden TXA<sub>2</sub> eine wesentliche den Gefäßdruck modulierende Wirkung auszuüben. In der Versuchsreihe IV „übernimmt“ die Cyclooxygenase-Hemmung diese Funktion, infolgedessen ist die *Potenzierung* des Druckanstiegs vollständig aufgehoben.

In der Literatur wurden bisher mögliche Interaktionen zwischen verschiedenen Bradykinin-Autakoiden in der Lungenstrombahn noch wenig untersucht.

Nach der vorliegenden Studie ist NO in der Lage, die Fähigkeit des Bradykinins zu limitieren, eine TXA<sub>2</sub>-Ausschüttung in der Lungenstrombahn hervorzurufen.

Einen *vom Prinzip her vergleichbaren Mechanismus* haben LEWIS ET AL 1999 [112] für einen anderen pathophysiologischen Zusammenhang veröffentlicht: die *Broncho*-konstriktion über Endothelin (ET-1) an der Meerschweinchenlunge. Auch hier vermuteten die Autoren, daß das endogenen NO in der Lage ist, die in diesem Fall durch ET-1 induzierte TXA<sub>2</sub>-Ausschüttung zu reduzieren. Diese Hemmung entfiel durch L-NAME, infolgedessen dann die erhöhten Thromboxan A<sub>2</sub>-Konzentration eine verstärkende Wirkung auf die Kontraktion der bronchialen Muskulatur entfalten konnte.

LEWIS ET AL konnten darüber hinaus ebenfalls einen Zusammenhang zwischen einer NO-Synthasehemmung mittels L-NAME und einer gesteigerten TXA<sub>2</sub>-Freisetzung nachweisen. An der isolierten Meerschweinchenlunge kam es nach einer 30-minüti-

gen Infusion von L-NAME in den von diesen Autoren durchgeführten Versuchsreihen bei einer nachfolgenden Bradykinin-Gabe zu einer Potenzierung der Thromboxan A<sub>2</sub>-Freisetzung [111].

Sicherlich bedarf es weiterer experimenteller Studien, um die genauen pathophysiologischen Zusammenhänge weiter aufklären bzw. bestätigen zu können.

Insbesondere gilt es zu überprüfen, ob die beschriebene Interaktion der beiden Kinin-Autakoide auch für noch höhere Bradykinin-Konzentrationen ( $> 10^{-6}$  mol/l) als die in der vorliegenden Arbeit verwendeten zutreffen, da sich, wie oben bereits erläutert, die absoluten Mengen des ausgeschütteten Thromboxan A<sub>2</sub> abhängig von der verwendeten Bradykinin-Dosierung ändern.

Von weiterer Bedeutung ist auch die Frage der für die Versuche genutzten Tierspezies bzw. die Übertragbarkeit der (an der Kaninchenlunge) gewonnenen Ergebnisse auf andere Spezies.

So schwanken die Reaktionen auf Bradykinin-Substitutionen in Anwesenheit einer NO-Synthasehemmung zwischen einerseits überhaupt keinem Effekt an der Rattenlunge [139], andererseits Wirkungsumkehr der Druckreaktion nach L-NAME-Applikation ebenfalls an der Rattenlunge [3] und schließlich Abschwächung einer zuvor durch Bradykinin hervorgerufenen *Vasodilatation* in der Katzenlunge [45].

Demzufolge würde in den zitierten experimentellen Untersuchungen NO jeweils eine andere regulatorische Funktion mit teilweise sogar intraspezifischen Wirkungsdifferenzen einnehmen. Allerdings muß neben sicherlich vorhandenen Speziesunterschieden in der Reaktion auf Kinine weiterhin berücksichtigt werden, daß in den verschiedenen Arbeiten sehr unterschiedliche Versuchsmethoden und insbesondere auch divergierende Bradykinin-Konzentrationen verwendet wurden.

Diese lassen sich untereinander nur sehr schwer vergleichen, da sich der entscheidende Parameter – die lokale Bradykinin-Konzentration in der Lungenstrombahn – aufgrund der in den Arbeiten nicht genau definierten bzw. unterschiedlichen Applikationsgeschwindigkeiten [3, 139] oder nur ungenauen Angaben zu dem Verteilungsvolumen [45] nicht exakt berechnen läßt.

Um diese kontroversen Resultate weiter abzuklären, müßten standardisierte Versuchsmethodiken und vergleichbare (z.B. gewichtsbezogene) Dosierungen bzw. Endkonzentrationen der jeweiligen Pharmaka im Perfusat- oder Blutkreislauf verwendet werden.

Im Rahmen der Besprechung der Funktion von NO in der pulmonalen Gefäßstrombahn und seinen Interaktionen mit TXA<sub>2</sub> soll ergänzend noch auf neuere Erkenntnisse verschiedener experimenteller Arbeiten kurz eingegangen werden.

Ein erhöhtes Ansprechen auf den vasokonstriktorisches Effekt des TXA<sub>2</sub> bei gleichzeitiger Hemmung der endogenen NO-Synthase konnten NISHIWAKI ET AL 1992 [136] in der pulmonalen Strombahn des Hundes sowie WRIGHT ET AL 1999 [198] in der Rattenlunge nachweisen. Nach diesen Ergebnissen ist die Lungenstrombahn in der Lage, auf eine Stimulation von TXA<sub>2</sub> mit einer gesteigerten Ausschüttung von NO zu reagieren. Daß NO in der pulmonalen Strombahn ein wichtiger Modulator der pulmonalen Druckantwort auf Vasokonstriktoren wie TXA<sub>2</sub> (respektive dem TXA<sub>2</sub> – Analogon U-46619) ist, konnten KAVANAGH ET AL 1996 auch in der pulmonalen Strombahn des Kaninchens zeigen [103].

Damit scheint sich für das NO – neben seinem limitierenden Einfluß auf die Effektivität eines Agonisten, einen TXA<sub>2</sub>-Ausstoß und damit einen vasokonstriktorisches

Effekt hervorzurufen – eine ergänzende, ebenfalls gefäßprotektive Funktion abzuzeichnen.

Vorstellbar ist ein bestimmtes Gleichgewichtsverhältnis der beiden Bradykinin-Autakoide NO und TXA<sub>2</sub>. Fällt nun ein Anteil dieses Gleichgewichts, z.B. das vasodilatierende NO weg – experimentell simuliert durch eine pharmakologische NO-Synthasehemmung – überwiegt die vasokonstriktorische Wirkung des TXA<sub>2</sub>.

Am Herzen ist die klinische Bedeutung eines solchen funktionellen Antagonismus bereits näher untersucht. Durch Thromboxan A<sub>2</sub> kann es bei einem reduzierten „Gegenspieler NO“ im Rahmen einer endothelialen Dysfunktion, wie es z.B. aufgrund komplexer pathophysiologischer Ursachen bei der Atherosklerose vor- kommt, zu einem lokalen Gefäßspasmus kommen. Dieser wirkt sich neben weiteren Endothel-abhängigen Mechanismen wiederum ungünstig im Sinne einer gesteigerten Thrombusbildung und somit als eine der Ursachen einer KHK-Symptomatik aus [87].

#### 4.9 ABHÄNGIGKEIT DER WIRKUNGSINTENSITÄT DES NO VOM AUSGANGSTONUS

Ein einheitliches Fazit über die Wirkung des endogenen NO in seiner Eigenschaft als Regulator des *basalen* pulmonalarteriellen Gefäßtonus und damit, bei konstantem Flow, des pulmonalarteriellen Drucks kann aufgrund widersprüchlicher Versuchsergebnisse nicht gezogen werden. Hierauf ist bereits in der Einleitung dieser Arbeit eingegangen worden.

Übereinstimmend mit der Mehrzahl der experimentellen Resultate scheint NO aber auch in der isolierten Kaninchenlunge – genau wie bei isolierten Lungengefäßen des menschlichen Organismus [40] – zur Aufrechterhaltung des basalen Gefäßtonus beizutragen. Dies zeigten insbesondere die Vorversuche der vorliegenden Arbeit. Dosisabhängig war es bei einer NO-Synthasehemmung mittels L-NAME zu unterschiedlich schnellen, teils irreversiblen Druckanstiegen gekommen.

Auch für die Bradykinin-induzierten Effekte scheint ein erhöhter *Gefäßwiderstand* zum Applikationszeitpunkt, aufgrund einer unter diesen Bedingungen gesteigerten modulatorischen Fähigkeit des NO, von wichtiger Bedeutung zu sein. Dies zeigen experimentelle Arbeiten, bei denen der Ausgangstonus mittels hypoxischer Beatmung oder auch durch das TXA<sub>2</sub>-Analogon U-46619 artifiziell erhöht wurde.

RUSSELL ET AL [159] publizierte 1990 den Einfluß von Hypoxie auf die Druckveränderungen der pulmonalen Gefäße infolge von Bradykinin-Applikationen an gesunden und chronisch-hypoxischen isolierten Rattenlungen. Bei den letztgenannten lag eine pulmonale Hypertonie mit erhöhtem Gefäßtonus vor. Bei den chronisch-hypoxischen Rattenlungen kam es auf Bradykinin zu einer Vasodilatation, in der Kontrollgruppe dagegen zu einer jeweils dosisabhängigen Vasokonstriktion. Somit werden – zumindest in der Rattenlunge – die Auswirkungen einer Kinin-Substitution von einer gesteigerten Autakoid-Potenz bei erhöhtem Gefäßtonus beeinflusst.

Auch ARCHER ET AL [4] sowie OKA ET AL [141] wiesen die wesentliche Bedeutung des NO bei erhöhtem Gefäßwiderstand an (chronisch) hypoxischen Rattenlungen nach. Für den Kaninchenorganismus konnte dieser wichtige Effekt sowohl an der *isolierten* Kaninchenlunge von WALMRATH ET AL [187] und UNCLES ET AL [182] als auch am anästhesierten Kaninchen im Ganztiersversuch von SPRAGUE ET AL [176] sowie KAVANAGH ET AL [103] aufgezeigt werden.

Zusammenfassend bestätigen alle genannten experimentellen Arbeiten zumindest die pathophysiologische Vorstellung, daß unter den Bedingungen einer *erhöhten basalen Gefäßresistenz* eine vermehrte NO-Freisetzung eine wichtigere Rolle in der Aufrechterhaltung der pulmonalen Druckverhältnisse spielt, als bei einem physiologischen Gefäßtonus.

#### **4.10 EINFLUß DER GEWÄHLTEN VERSUCHSMETHODIK AUF DIE INTERPRETATION DER ERHALTENEN ERGEBNISSE**

Ob die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhaltenen Resultate an der *isolierten* Kaninchenlunge und die aufgezeigten Interaktionen der verschiedenen Substanzen auch auf den *gesamten Organismus* mit der gleichen pathophysiologischen Relevanz übertragen werden können, sollte in weiteren Studien näher untersucht werden.

Bei der Interpretation der erhaltenen Ergebnisse müssen die Besonderheiten der angewendeten Versuchsmethoden sowie auch die physiologischen Eigenschaften eines intakten Organismus berücksichtigt werden.

Mit der Frage der Übertragbarkeit von Ergebnissen von Experimenten an isolierten Lungenmodellen auf *in vivo*-Verhältnisse haben sich mehrere Arbeitsgruppen beschäftigt [90, 103, 147].

- HYMAN ET AL [90] untersuchten mittels einer neuen Herzkathetertechnik in der Rattenlunge das Verhältnis von pulmonalarteriell Druck zu entsprechendem Blutfluß im intakten Versuchstier unter physiologischen Bedingungen. Die so gewonnenen Daten waren teilweise konträr zu den am isolierten Organmodell erhaltenen Resultaten.
- Unterschiede bezüglich der Wirkungseigenschaft von L-NAME auf den basalen Gefäßtonus erhielten KAVANAGH ET AL [103] bei ihren experimentellen Versuchsreihen an isolierten, mit einer physiologischen Perfusatlösung durchflossenen Lungen im Vergleich mit Versuchen an künstlich beatmeten „open-chest“-Kaninchen von PERSSON ET AL [147].
- Der NO-Inhibitor schien in den Versuchsreihen der zuletzt genannten Autoren den pulmonalen Gefäßtonus nachhaltiger zu beeinflussen als in der Strombahn des isolierten Organs. Indirekt konnten so Rückschlüsse auf die Bedeutung des NO in den verschiedenen Versuchsmodellen gezogen werden.

Experimentelle Untersuchungsergebnisse anderer Arbeiten zeigen mögliche pathophysiologische Mechanismen auf, *wie* diese kontroversen Reaktionen möglicherweise erklärbar sind.

- Unter physiologischen Bedingungen (in vivo) ist der pulmonale Gefäßwiderstand auch von der kardialen Auswurfleistung abhängig. Der Widerstand im pulmonalen Gefäßbett fällt mit steigender Auswurfleistung, da es durch den erhöhten Fluß über verstärkte Scherkraftmechanismen vor allem zu einer gesteigerten Freisetzung des relaxierenden NO kommt, wie auch für die Kaninchenlunge gezeigt werden konnte [175, 196]. Auch hier scheint es al-

lerdings speziesspezifische Unterschiede zu geben, wie BARNARD ET AL beschrieben [10].

- An der isolierten Rattenlunge konnten WILSON ET AL [196] im direkten Vergleich zeigen, daß es Unterschiede in den pathophysiologischen Auswirkung einer NO-Synthasehemmung gibt, je nachdem, ob die isolierten Lungen entweder mit einem konstanten *Flow* oder einem konstanten *Druck* perfundiert wurden.
- 1995 und 1996 publizierte Ergebnisse von SPRAGUE ET AL [174] an der isolierten Kaninchenlunge und UNCLES ET AL [182] an der isolierten Rattenlunge wiesen außerdem darauf hin, daß das verwendete *Perfusatmedium* einen entscheidenden Einfluß auf die NO-vermittelte pulmonale Gefäßreaktionen hat. Die beiden Arbeitsgruppen erhielten durch vergleichende Untersuchungen in beiden Spezies übereinstimmend das Ergebnis, daß NO vor allem in den mit Blut bzw. bluthaltigen Medien perfundierten Lungen (relaxierend) an der Regulation des pulmonalen Gefäßwiderstands teilnahm, während in den Organen, die mit einer physiologischen Pufferlösung durchströmt wurden, NO keine signifikanten Effekte auf den Gefäßtonus hatte.
- In der vorliegenden Arbeit kam eine zell- bzw. blutfreie Perfusatlösung zum Einsatz. Bei der Diskussion über eine Übertragung der vorliegenden Ergebnisse auf in-vivo-Verhältnisse muß auch die Funktion von **Leukozyten** und **Thrombozyten** mit deren Fähigkeit zur Ausschüttung von Arachidonsäuremetaboliten berücksichtigt werden. So kommt es bei einer Aktivierung von Thrombozyten z.B. im Rahmen von Gefäßverletzungen mit Aktivierung des Gerinnungssystems oder auch beim peripheren Kreislaufversagen unterschiedlichster Genese u.a. zur Ausschüttung des vasokonstriktorisch wir-



kenden  $\text{TXA}_2$ , das aufgrund des gewählten Versuchsmethodik in der vorliegenden Arbeit unberücksichtigt bleibt. Auch eine Vielzahl weiterer bei der Aktivierung von Thrombozyten ausgeschütteter gefäßaktiver Substanzen wie z.B. 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) oder PDGF (platelet derived growth factor) muß unter in vivo Bedingungen berücksichtigt werden.

Vergleichbares gilt auch für die Aktivierung von Leukozyten und Lymphozyten, die durch physiologische, pathophysiologische, chemische oder pharmakologische Stimuli eine Vielzahl von gefäßaktiven Mediatoren freisetzen können.

So vermittelt z.B. freigesetztes Histamin über seinen G-Protein-gekoppelten  $\text{H}_1$ -Rezeptor – ebenso wie das Bradykinin über den  $\text{B}_2$ -Rezeptor – eine Aktivierung der Phospholipase C mit konsekutiver Aktivierung von Proteinkinasen und der Phospholipase  $\text{A}_2$ . Über die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  kommt es zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur. In Endothelzellen aktiviert ein durch Stimulation von  $\text{H}_1$ -Rezeptoren induzierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg die NO-Synthase, das vermehrt gebildete NO kann zur Vasodilatation der glatten Gefäßmuskelzelle führen. Ein weiterer Mediator ist das 5-Hydroxytryptamin [5-HT, Serotonin], das über  $5\text{-HT}_{2A}$ -Rezeptoren auf der Thrombozytenmembran zusätzlich zu möglichen eigenen vasoaktiven Effekten mit den Blutplättchen interagieren kann [64].

Der Einfluß der oben genannten Mediatoren ist mit dem gewählten Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit nicht zu berücksichtigen. Gerade hinsichtlich der in der Einleitung beschriebenen HMW-Kininogen-Bindungsstellen auf z.B. Thrombozyten und Granulozyten [in 209] ergeben sich auch Interaktionen mit der Muttersubstanz von Bradykinin, die bei einer zellfreien

Perfusatlösung vernachlässigt werden. Hier ergeben sich Ansätze für weiterführende experimentelle Untersuchungen.

Bereits bei der Diskussion der einzelnen Metaboliten wurde immer wieder auf die Schwierigkeit eines Vergleichs zwischen den in den unterschiedlichen Arbeiten gewonnenen Ergebnissen v.a. aufgrund der teilweise völlig verschiedenen Versuchsmethodiken hingewiesen. REGOLI UND BARABÉ [152] zeigten bereits in einer 1980 erschienenen Kinin-Übersichtsarbeit auf, daß an isolierten Organen erhobene Daten nur unter Vorbehalt auf *in vivo*-Verhältnisse übertragbar sind.

Die oben aufgeführten Mechanismen können mit dazu beitragen, in der Literatur beschriebene, zunächst widersprüchlich erscheinende Resultate hinsichtlich der Funktion vasoaktiver Kinine bzw. deren Autakoide zu differenzieren und die Bedeutung der in den verschiedenen Versuchsmodellen erhaltenen Resultate besser verstehen bzw. interpretieren zu können.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUßFOLGERUNG

In der vorliegenden Studie sollten am Modell der isolierten und perfundierten Kaninchenlunge die bisher noch nicht genau bekannten Effekte von Bradykinin und seiner Autakoide NO, PGI<sub>2</sub> und TXA<sub>2</sub> in der pulmonalen Gefäßstrombahn weiter aufgeklärt werden.

Hierzu wurden nach einem sich ergänzenden Applikationsschema der selektive cNOS-Synthasehemmer L-NAME und der Cyclooxygenasehemmer Diclofenac in die Lungenstrombahn zwischen intermittierenden Bradykinin-Bolusgaben injiziert. Entscheidender Meßparameter war der pulmonalarterielle Druck (PAP), der direkt die Änderungen des Gefäßwiderstands widerspiegelte. Laborchemisch wurden die stabilen Abbauprodukte von Thromboxan A<sub>2</sub> und Prostazyklin bestimmt.

Bradykinin in einer im Perfusatkreislauf vorliegenden Endkonzentration von 10<sup>-6</sup> mol/l führte zu gut reproduzierbaren und reversiblen Druckanstiegen.

Die NO-Inhibition mit einer L-NAME-Konzentration von 10<sup>-7</sup> mol/l führte zu einer signifikanten *Verstärkung* des Bradykinin-induzierten PAP-Anstiegs. Diese Potenzierung der Druckreaktion wurde durch eine Cyclooxygenasehemmung vollständig verhindert.

Weiterhin konnten die durchgeführten Versuchsreihen zeigen, daß weder die NO- noch die Cyclooxygenase-Inhibition einen Einfluß auf die grundsätzliche Bradykinin-Reaktion im pulmonalen Gefäßbett hatte: Es kam in Anwesenheit *beider* Hemmstoffe zu einem unveränderten Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Dies impliziert, daß – bei der in der Studie verwendeten Bradykinin-Dosierung – der Anstieg des Gefäßwiderstands nicht durch

Mediatoren, sondern durch eine *direkte* Wirkung des in hohen lokalen Konzentrationen vorliegenden Bradykinins auf die glatte Gefäßmuskulatur induziert ist. Ob im Zuge dieser hohen Konzentrationen durch ein „Weiterspülen“ des Bradykinins mit dem Perfusionsflow auch in den pulmonalvenösen Abschnitten der Kaninchenlunge noch eine vasokonstriktive Reaktion hervorgerufen wurde, kann aufgrund der gewählten Versuchsmethodik der vorliegenden Studie nicht beurteilt werden.

Genau wie in der systemischen Zirkulation wird auch im pulmonalen Gefäßbett durch Bradykinin das Arachidonsäuresystem aktiviert. Nach einer alleinigen Bradykinin-Applikation konnte statistisch allerdings lediglich ein signifikanter Anstieg des TXA<sub>2</sub> nachgewiesen werden.

Anders verhielt sich die Synthese der Arachidonsäuremetaboliten in Anwesenheit von L-NAME. Unter der NO-Inhibition kam es – Bradykinin-induziert – neben einer deutlich verstärkten TXA<sub>2</sub>-Ausschüttung jetzt auch zu einem signifikanten Anstieg der PGI<sub>2</sub>-Produktion.

Zusammenfassend lassen die in der vorliegenden Studie erhobenen Resultate folgende wichtige Rückschlüsse hinsichtlich der Funktion bzw. Wirkungsweise der Bradykinin-Autakoide in der pulmonalen Strombahn zu:

1. Bei der für die Versuchsreihen gewählten Bradykinin-Konzentration hat das **Thromboxan A<sub>2</sub>** keinen wesentlichen Einfluß auf den Bradykinin-induzierten PAP-Anstieg, wohingegen der Arachidonsäuremetabolit entscheidend für die **Druckpotenzierung** bei gleichzeitiger NO-Synthasehemmung verantwortlich ist.

2. **NO** *mäßigt* in der pulmonalen Strombahn den vasokonstriktiven Effekt von Bradykinin. Ausschlaggebend für die Modulation des pulmonalarteriellen Druckanstiegs scheint die Fähigkeit des Stickstoffmonoxids zu sein, die Bradykinin-induzierte Thromboxan-Ausschüttung zu limitieren.

Damit nimmt das NO eine „Schutzfunktion“ vor zu hohen pulmonalen Druckanstiegen wahr. Thromboxan A<sub>2</sub> wird bei einem „Durchbrechen“ dieser physiologischen „Barriere“ zu einem bedeutenden Mediator.

3. Der zweite gemessene Arachidonsäuremetabolit **PGI<sub>2</sub>** spielt bei der Vermittlung der Bradykinin-Wirkung im pulmonalen Gefäßbett des Kaninchens nach den vorliegenden Ergebnissen keine entscheidende Rolle. Obwohl es unter einer NO-Synthasehemmung zu einem signifikanten Anstieg des Metaboliten kam, führte eine erneute Bradykinin-Bolusgabe zu einer deutlichen Potenzierung des pulmonalarteriellen Drucks.

Von **klinischer Bedeutung** sind die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zum einen für die Anwendung von ACE-Hemmern, die, begründet durch ihr Wirkprinzip, eine lokale Akkumulation von Bradykinin induzieren können. Im Gegensatz zur koronaren Strombahn, wo der genaue Mechanismus und Nutzen eines solchen Effekts bereits intensiv erforscht wurde, besteht für die Lungengefäße diesbezüglich noch intensiver Forschungsbedarf.

Die Resultate der vorliegenden Studie zeigen, daß die Lungenstrombahn insbesondere dann sehr sensitiv auf eine Bradykinin-induzierte Wirkung anspricht, wenn physiologischerweise vorhandene Gegenregulationsmechanismen gehemmt sind.

Eine klinische Relevanz ergibt sich auch für die Sepsis. Hier kommt es zu hohen systemischen und lokalen Bradykinin-Konzentrationen, die infolge einer endo-

thelialen Dysfunktion zu einer pulmonalen Vasokonstriktion führen. In den letzten Jahren wurden in experimentellen Studien therapeutische Ansätze mit verschiedenen Bradykinin-Rezeptorantagonisten erprobt, die Ergebnisse waren widersprüchlich [63, 157]. Ob Bradykinin-Antagonisten sich in der Therapie der Sepsis durchsetzen, ist zur Zeit ungewiß. FISCHER ET AL [63] wiesen in einer im März 2000 veröffentlichten Arbeit darauf hin, daß Cyclooxygenaseprodukte eine wesentliche Rolle in der Modulation septischer Prozesse u.a. am Endothel spielen. Auch in den Versuchsreihen der vorliegenden Arbeit konnte – bei vorheriger Hemmung der endothelialen NO-Produktion – durch eine unselektive Cyclooxygenasehemmung die pulmonale Vasokonstriktion deutlich reduziert werden. Weitere Studien müssen diese Resultate bestätigen, um evtl. eine Therapiestrategie der Sepsis-induzierten endothelialen Dysfunktion in der pulmonalen Strombahn entwickeln zu können.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 **Aksoy MO, Harakal C, Smith JB, Stewart GJ, Zerweck CR:**  
Mediation of bradykinin-induced contraction in canine veins via thromboxane/prostaglandin endoperoxide receptor activation.  
Br J Pharmacol 99(3):461-6, 1990.
- 2 **Altura BM, Chand N:**  
Bradykinin-induced relaxation of renal and pulmonary arteries is dependent upon intact endothelial cells.  
Br J Pharmacol 74(1):10-11, 1981.
- 3 **Archer SL, Rist K, Nelson DP, DeMaster EG, Cowan N, Weir EK:**  
Comparison of the hemodynamic effects of nitric oxide and endothelium-dependent vasodilators in intact lungs.  
J Appl Physiol 68(2):735-47, 1990.
- 4 **Archer SL, Tolins JP, Raij L, Weir EK:**  
Hypoxic pulmonary vasoconstriction is enhanced by inhibition of the synthesis of an endothelium derived relaxing factor.  
Biochem Biophys Res Commun 164(3):1198-205, 1989.
- 5 **Auch-Schwelk W, Kuchenbuch C, Claus M, Walther B, Bossaller C, Friedel N, Graf K, Grafe M, Fleck E:**  
Local regulation of vascular tone by bradykinin and angiotensin converting enzyme inhibitors.  
Eur Heart J 14 (Suppl I):154-60, 1993.
- 6 **Baker Jr. CRF, Little AD, Beall CV, Little GH, Canizaro PC, Behal FJ:**  
Kinin metabolism in the perfused ventilated rat lung. II: Influence of ventilation, perfusion, and perfusate composition variation on bradykinin metabolism in uninjured lung.  
Circulatory Shock 37:280-290, 1992.
- 7 **Baker Jr. CRF, Little AD, Little GH, Canizaro PC, Behal FJ:**  
Kinin metabolism in the perfused ventilated rat lung. I: Bradykinin Metabolism in a system modeling the normal, uninjured lung.  
Circulatory Shock 33:37-47, 1991.
- 8 **Bakhle YS, Moncada S, de Nucci G, Salomon JA:**  
Differential release of eicosanoids by bradykinin, arachidonic acid and calcium ionophore A23187 in guinea-pig isolated perfused lung.  
Br J Pharmacol 86(1):55-62, 1985.
- 9 **Barabé J, Marceau F, Theriault B, Drouin JN, Regoli D:**  
Cardiovascular actions of kinins in the rabbit.  
Can J Physiol 57(1):78-91, 1979.
- 10 **Barnard JW, Wilson PS, Moore TM, Thompson WJ, Taylor AE:**  
Effect of nitric oxide and cyclooxygenase products on vascular resistance in dog and rat lungs.  
J Appl Physiol 74(6):2940-8, 1993.

- 11 **Barrow SE, Dollery CT, Heavey DJ, Hickling NE, Ritter JM, Vial J:**  
Effect of vasoactive peptides on prostacyclin synthesis in man.  
Br J Pharmac 87:243-247, 1986.
- 12 **Bathon JM, Proud D:**  
Bradykinin antagonists.  
Annu Rev Pharmacol Toxicol 31:129-162, 1991.
- 13 **Berkowitz BA, Zabko-Potapovich B, Valocik R, Gleason JG:**  
Effects of the leukotrienes on the vasculature and blood pressure of different species.  
J Pharmacol Exp Ther 229:105-112, 1984.
- 14 **Bhagwat SS, Hamann PR, Still WC, Bunting S, Fitzpatrick FA:**  
Synthesis and structure of the platelet aggregation factor thromboxane A<sub>2</sub>.  
Nature 315:511-513, 1985.
- 15 **Boie Y, Rushmore TH, Darmon-Goodwin A, Grygorczyk R, Slipetz DM, Metters KM, Abramovitz M:**  
Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid IP receptor.  
J Biol Chem 269(16):12173-8, 1994.
- 16 **Bönner G, Chrosch R:**  
Kinine und ACE-Hemmer.  
München, Arcis Verlag: 1-51, 1994.
- 17 **Bönner G, Iwersen D, Shiamoto K:**  
The analytical value for kinin concentration in blood depends on the antiserum used in the bradykinin radioimmunoassay.  
J Clin Chem Clin Biochem 25(1):39-43, 1987.
- 18 **Bönner G, Preis S, Schunk U, Iwersen D:**  
Hemodynamic effects of kinins and their role in blood pressure regulation. In: Fritz H, Schmidt I, Dietze G: The kallikrein-kinin-system in health and disease.  
Braunschweig, Limbach Verlag: 79-69, 1989.
- 19 **Bönner G, Preis S, Schunk U, Toussaint C, Kaufmann W:**  
Hemodynamic effects of bradykinin on systemic and pulmonary circulation in healthy and hypertensive humans.  
J Cardiovasc Pharmacol 15 (Suppl 6):46-56, 1990.
- 20 **Bönner G, Preis S, Schunk U, Wagmann M, Chrosch R, Toussaint C:**  
Effect of Bradykinin on arteries and veins in systemic and pulmonary circulation.  
J Cardiovasc Pharmacol 20 (Suppl 9):21-27, 1992.
- 21 **Bönner G, Rahn KH:**  
Prostazyklin und Hypertonie, 2. erw. Auflage.  
Heidelberg, Springer Verlag, 1989.
- 22 **Bönner G, Schunk U, Preis S, Wambach G, Toussaint T:**  
Effect of bradykinin on systemic and pulmonary hemodynamics in the human.  
Klin Wochenschr 67(21):1085-95, 1989.



- 23 **Bönner G:**  
Das renale Kallikrein-Kinin-System.  
Heidelberg, Springer Verlag, 1989.
- 24 **Bönner G:**  
Kinin related effects of ACE-inhibition.  
Clin Physiol Biochem 8 (Suppl 7):6-15, 1989.
- 25 **Breil I, Koch T, Belz M, Van Ackern K, Neuhof H:**  
Effects of bradykinin, histamine and serotonin on pulmonary vascular resistance and permeability.  
Acta Physiol Scand 159(3):189-98, 1997.
- 26 **Buga GM, Gold ME, Wood KS, Chaudhuri G, Ignarro LJ:**  
Endothelium-derived nitric oxide relaxes nonvascular smooth muscle.  
Eur J Pharmacol 161(1):61-72, 1989.
- 27 **Buga GM, Griscavage JM, Rogers NE, Ignarro LJ:**  
Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide.  
Circ Res 73(5):808-12, 1993.
- 28 **Burch RM, Farmer SG, Steranka LR:**  
Bradykinin receptor antagonists.  
Med Res Rev 10(2):237-69, 1990.
- 29 **Busse R, Fleming I, Hecker M:**  
Endothelium-derived bradykinin: implications for angiotensin-converting enzyme-inhibitor therapy.  
J Cardiovasc Pharmacol 22 (Suppl 5):S31-6, 1993.
- 30 **Busse R, Pohl U, Luckhoff A:**  
Mechanisms controlling the production of endothelial autacoids.  
Z Kardiol 78 (Suppl 6):64-9, 1989.
- 31 **Cai Z, Xin J, Pollock DM, Pollock JS:**  
Shear stress-mediated NO production in inner medullary collecting duct cells.  
Am J Physiol Renal Physiol 279(2):F270-4, 2000.
- 32 **Carretero OA, Scicli AG:**  
The renal kallikrein-kinin system.  
Am J Physiol 238:F247-255, 1988.
- 33 **Champion HC, Kadowitz PJ:**  
Vasodilator responses to acetylcholine, bradykinin, and substance P are mediated by a TEA-sensitive mechanism.  
Am J Physiol 273(1 Pt 2):R414-22, 1997.
- 34 **Chand N, Mahoney TP Jr, Diamantis W, Sofia RD:**  
Pharmacological modulation of bradykinin-, acetylcholine- and calcium ionophore A23187-induced relaxation of rabbit pulmonary arterial segments.  
Eur J Pharmacol 137(2-3):173-7, 1987.
- 35 **Cherry PD, Furchgott RF, Zawadzki JV, Jothianandan D:**  
Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin.  
Proc Natl Acad Sci USA 79(6):2106-10, 1982.

- 36 Clark MA, Bomalaski JS, Conway TM, Wartell J, Crooke ST:**  
Differential effects of aspirin and dexamethason on phospholipase A<sub>2</sub> and C activities and arachidonic acid release from endothelial cells in response to bradykinin and leukotriene D<sub>4</sub>.  
Prostaglandins 32(5): 703-8, 1986.
- 37 Coleman RA, Smith WL, Narumiya S:**  
International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution and structure of the receptors and their subtypes.  
Pharmacol Rev 46:205-29, 1994.
- 38 Collier J, Vallance P:**  
Role of nitric oxide in the vasodilator response to bradykinin in human peripheral veins and arteries in situ.  
Kinin 91-Abstract book:47, 1991.
- 39 Crawley DE, Liu SF, Evans TW, Barnes PJ:**  
Inhibitory role of endothelium-derived relaxing factor in rat and human pulmonary arteries.  
Br J Pharmacol 101(1):166-70, 1990.
- 40 Cremona G, Wood AM, Hall LW, Bower EA, Higenbottam T:**  
Effect of inhibitors of nitric oxide release and action on vascular tone in isolated lungs of pig, sheep, dog and man.  
J Physiol 481(Pt 1):185-95, 1994.
- 41 Crutchley DJ, Ryan JW, Ryan US, Fisher GH:**  
Bradykinin-induced release of prostacyclin and thromboxanes from bovine pulmonary artery endothelial cells.  
Biochim Biophys Acta 751(1):99-107, 1983.
- 42 D'Orleans-Juste P, de Nucci G, Vane JR:**  
Kinins act on B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors to release conjointly endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells.  
Br J Pharmacol 96(4):920-6, 1989.
- 43 Del Basso P, Argiolas L:**  
Cardiopulmonary effects of endothelin-1 in the guinea pig: role of thromboxane A<sub>2</sub>.  
J Cardiovasc Pharmacol 26 (Suppl 3):S120-2, 1995.
- 44 DeWitt BJ, Champion HC, Marrone JR, McNamara DB, Giles TD, Greenberg SS, Kadowitz PJ:**  
Differential effects of L-N5-(1-iminoethyl)-ornithine on tone and endothelium-dependent vasodilator responses  
Am J Physiol 273(3 Pt 1):L588-94, 1997.
- 45 DeWitt BJ, Cheng DY, McMahon TJ, Nossaman BD, Kadowitz PJ:**  
Analysis of responses to bradykinin in the pulmonary vascular bed of the cat.  
Am J Physiol 266(6 Pt 2):H2256-67, 1994.
- 46 Dinh-Xuan AT:**  
Endothelial modulation of pulmonary vascular tone.  
Eur Respir J 5(6):757-62, 1992.

- 47 Dorer FE, Eyan JW, and Stuart JM:**  
Hydrolysis of bradykinin and its higher homologues by angiotensin-converting enzyme.  
J Biochem 141:915-917, 1984.
- 48 Dray A, Perkins M:**  
Bradykinin and inflammatory pain.  
Trends Neurosci 16:99-104, 1993.
- 49 Drexler, H, Hornig B:**  
Endothelial dysfunction in human disease.  
J Mol Cell Cardiol 31(1):51-60, 1999.
- 50 Eguchi D, Nishimura J, Kobayashi S, Komori K, Sugimachi K, Kanaide H:**  
Mechanism of contraction induced by bradykinin in the rabbit saphenous vein.  
Br J Pharmacol 120(3):371-8, 1997.
- 51 Erdös EG:**  
Bradykinin, Kallidin and Kallikrein. In: Handbook of Experimental Pharmacology.  
New York, Springer Verlag, 15:427-488, 1979.
- 52 Erdös EG:**  
Bradykinin, Kallidin and Kallikrein. In: Handbook of Experimental Pharmacology.  
Heidelberg, Springer Verlag, Suppl vol. 25, 1992.
- 53 Evans HG, Smith JA, Lewis MJ:**  
Release of endothelium-derived relaxing factor is inhibited by 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate.  
J Cardiovasc Pharmacol 12(6):672-7, 1988.
- 54 Faltin DL, Weber A, Lacroix JS, Jorge-Costa M, Morel DR:**  
Lung mechanics and pulmonary but not systemic vascular responses to ET-1 are Tx and infusion rate dependent.  
J Appl Physiol 80(5):1716-23, 1996.
- 55 Farmer SG, Burch RM, Meeker SA, Wilkins DE:**  
Evidence for a pulmonary B<sub>3</sub> bradykinin receptor.  
Mol Pharmacol 36:1-8, 1989.
- 56 Farrukh IS, Sciuto AM, Spannhake EW, Gurtner GH, Michael JR:**  
Leukotriene D<sub>4</sub> increases pulmonary vascular permeability and pressure by different mechanisms in the rabbit.  
Am Rev Respir Dis 134(2):229-32, 1986.
- 57 Feletou M, Girard V, Canet E:**  
Different involvement of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation of porcine pulmonary artery and vein: influence of hypoxia.  
J Cardiovasc Pharmacol 25(4):665-73, 1995.
- 58 Feletou M, Martin CA, Molimard M, Naline E, Germain M, Thureau C, Fauchere JL, Canet E, Advenier C:**  
In vitro effects of HOE 140 in human bronchial and vascular tissue.  
Eur J Pharmacol 274(1-3):57-64, 1995.

- 59 Feletou M, Vanhoutte PM:**  
The alternative: EDHF.  
J Mol Cell Cardiol 31(1):15-22, 1999.
- 60 Ferreira SH, Vane JR:**  
The detection and estimation of bradykinin in the circulating blood.  
Brit J Pharmacol 29:367-77, 1967.
- 61 Figini M, Ricciardolo FL, Javdan P, Nijkamp FP, Emanuelli C, Pradelles P, Folkerts G, Geppetti P:**  
Evidence that epithelium-derived relaxing factor released by bradykinin in the guinea pig trachea is nitric oxide.  
Am J Respir Crit Care Med 153(3):918-23, 1996.
- 62 Fineman JR, Heymann MA, Soifer SJ:**  
N-omega-nitro-L-arginine attenuates endothelium-dependent pulmonary vasodilation in lambs.  
Am J Physiol 260(4 Pt 2):H1299-306, 1991.
- 63 Fischer LG, Hollmann MW, Horstman DJ, Rich GF:**  
Cyclooxygenase inhibitors attenuate bradykinin-induced vasoconstriction in septic isolated rat lungs.  
Anesth Analg 90(3):625-31, 2000.
- 64 Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K:**  
In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 6.Auflage.  
Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, BI-Wissenschaftsverlag: 316–318, 1992.
- 65 Frantz E, Soifer SJ, Clyman RI, Heymann MA:**  
Bradykinin produces pulmonary vasodilation in fetal lambs: role of prostaglandin production.  
J Appl Physiol 67(4):1512-7, 1989.
- 66 Furchgott RF, Zawadzki JV:**  
The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholin.  
Nature 288(5789):373-6, 1980.
- 67 Gambone LM, Murray PA, Flavahan NA:**  
Synergistic interaction between endothelium-derived NO and prostacyclin in pulmonary artery: potential role for K<sup>+</sup>-ATP channels.  
Br J Pharmacol 121(2):271-9, 1997.
- 68 Gao Y, Zhou H, Raj JU:**  
Heterogeneity in role of endothelium-derived NO in pulmonary arteries and veins of full-term fetal lambs.  
Am J Physiol 268(4 Pt 2): H1586-92, 1995.
- 69 Gavras H, Gavras I:**  
Endothelial function in cardiovascular disease: the role of bradykinin.  
London, Science Press Ltd: 1-57, 1996.

- 70 Giles H, Leff P:**  
The biology and pharmacology of PGD<sub>2</sub>.  
Prostaglandins 35(2):277-300, 1988.
- 71 Gobeil F, Filteau C, Pheng LH, Jukic D, Nguyen-Le XK, Regoli D:**  
In vitro and in vivo characterization of bradykinin B<sub>2</sub> receptors in the rabbit and the guinea pig.  
Can J Physiol Pharmacol 74(2):137-44, 1996.
- 72 Gohlke P, Bunning P, Bonner G, Unger T:**  
ACE inhibitor effect on bradykinin metabolism in the vascular wall.  
Agents Actions Suppl 38 (Pt 3):178-85, 1992.
- 73 Goodman L, Gilman AG:**  
Pharmakologische Grundlagen der Arzneimitteltherapie, 9.Auflage.  
London, McGraw Hill, 609-32, 1999.
- 74 Groves P, Kurz S, Just H, Drexler H:**  
Role of endogenous bradykinin in human coronary vasomotor control.  
Circulation 92:3424-30, 1995.
- 75 Gryglewski RJ, Korbut R, Ocetkiewicz A, Splawinski J, Wojtaszek B, Swies J:**  
Lungs as a generator of prostacyclin – hypothesis on physiological significance.  
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 304(1):45-50, 1978.
- 76 Hall JM:**  
Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles.  
Pharmac Ther 56:131-190, 1992.
- 77 Halushka PV, Mais DE, Mayeux PR, Morinelli TA:**  
Thromboxane, prostaglandin and leukotriene receptors.  
Annu Rev Pharmacol Toxicol 29:213-239, 1989.
- 78 Hamberg M, Samuelsson B:**  
Role of endoperoxides in the biosynthesis and action of prostaglandins.  
In Prostaglandin synthetase inhibitors, H Robinson and JR Vane (eds.)  
New York, Raven Press, 107-119, 1976.
- 79 Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B:**  
Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides.  
Proc Natl Acad Sci USA 71:2994-98, 1975.
- 80 Hamilton LC, Michell JA, Tomlinson AM, Warner TD:**  
Synergy between cyclooxygenase-2 induction and arachidonic acid supply in vivo: consequences for nonsteroidal antiinflammatory drug efficacy.  
FASEB J 13(2):245-51, 1999.
- 81 Hampl V, Archer SL, Nelson DP, Weir EK:**  
Chronic EDRF inhibition and hypoxia: effects on pulmonary circulation and systemic blood pressure.  
J Appl Physiol 75(4):1748-57, 1993.

- 82 Hecker M, Bara AT, Busse R:**  
Angiotensin-converting enzyme inhibitors unmask endogenous kinin production by bovine coronary artery endothelium.  
Eur Heart J 14:161-3, 1993.
- 83 Hecker M, Benzing T, Busse R:**  
Stimulation of endothelial autacoid formation by inhibitors of angiotensin-converting enzyme.  
Agents Action 38 (Pt 3):163-70, 1992.
- 84 Hecker M, Blaukat A, Bara AT, Müller-Esterl W, Busse R:**  
ACE inhibitor potentiation of bradykinin-induced venoconstriction.  
Br J Pharmacol 121(7):1475-81, 1997.
- 85 Hecker M, Dambacher T, Busse R:**  
Role of endothelium-derived bradykinin in the control of vascular tone.  
J Cardiovasc Pharmacol 20 (Suppl 9):S55-61, 1992.
- 86 Heller LJ, Mohrman DE:**  
Comparison of blood pressure responses to intra-arterial and intra-venous injections of angiotensin I, angiotensin II and bradykinin.  
Life Sci 62(9):PL 121-5, 1998.
- 87 Hellige G, Spieckermann G:**  
Informationen zum Thema NO. In: Herz-Kreislauf Transparent, Hoechst Marion Roussel.  
Berlin, Verlag H.Hoffmann GmbH, 1998.
- 88 Hirata Y, Takata S, Takaichi S:**  
Specific biniding sites for bradykinin and its degradation process in cultured rat vascular smooth muscle cells.  
Adv Exp Med Biol 247A:415-420, 1990.
- 89 Hunt JA, Merrit JE, MacDermot J, Keen M:**  
Characterization of the thromboxane receptor mediating prostacyclin release from cultured endothelial cells.  
Biochem Pharmacol 43(8):1747-52, 1992.
- 90 Hyman AL, Hao Q, Tower A, Kadowitz PJ, Champion HC, Gumusel B, Lipton H:**  
Novel catheterization technique for the in vivo measurement of pulmonary vascular responses in rats.  
Am J Physiol 274(4 Pt 2):H1218-29, 1998.
- 91 Igari H, Tatsumi K, Sugito K, Kasahara Y, Saito M, Tani T, Kimura H, Kuriyama T:**  
Role of EDRF in pulmonary circulation during sustained hypoxia.  
J Cardiovasc Pharmacol 31(2):299-305, 1998.
- 92 Ignarro LJ, Buga GM, Chaudhuri G:**  
EDRF generation and release from perfused bovine pulmonary artery and vein.  
Eur J Pharmacol 149(1-2):79-88, 1988.

- 
- 93 Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G:**  
Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.  
Proc Natl Acad Sci USA 84(24):9265-9, 1987.
- 94 Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS, Chaudhuri G:**  
Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation.  
J Pharmacol Exp Ther 244(1):181-9, 1988.
- 95 Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS:**  
Endothelium derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical.  
Circ Res 61(6):866-79, 1987.
- 96 Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS:**  
Mechanisms of endothelium-dependent vascular smooth muscle relaxation elicited by bradykinin and VIP.  
Am J Physiol 253:H1074-82, 1987.
- 97 Johns RA:**  
Endothelium derived relaxing factor: basic review and clinical implications.  
J Cardiothorac Vasc Anesth 5(1):69-79, 1991.
- 98 Kadowitz PJ, Chapnick BM, Feigen LP, Hyman AL, Nelson PK, Spannhake EW:**  
Pulmonary and systemic vasodilator effects on the newly discovered prostaglandin, PGI<sub>2</sub>.  
J Appl Physiol 45(3):408-13, 1978.
- 99 Kadowitz PJ, Gruetter CA, Spannhake EW, Hyman AL:**  
Pulmonary vascular responses to prostaglandins.  
Fed Proc 40(7):1991-6, 1981.
- 100 Kadowitz PJ, Hyman AL:**  
Analysis of responses to leukotriene D<sub>4</sub> in the pulmonary vascular bed.  
Circ Res 55(5):707-17, 1984.
- 101 Kadowitz PJ, Hyman AL:**  
Comparative effects on thromboxane B<sub>2</sub> on the canine and feline pulmonary vascular bed.  
J Pharmacol Exp Ther 213(2):300-5, 1980.
- 102 Kadowitz PJ, Spannhake EW, Hyman AL:**  
Prostaglandins evoke a whole variety of responses in the lung.  
Environ Health Perspect 35:181-90, 1980.
- 103 Kavanagh BP, Thompson JS, Pearl RG:**  
Inhibition of endogenous nitric oxide synthase potentiates nitrovasodilators in experimental pulmonary hypertension.  
Anesthesiology 85(4):860-6, 1996.

- 104 Kemp BK, Cocks TM:**  
Evidence that mechanisms dependent and independent of nitric oxide mediate endothelium-dependent relaxation to bradykinin in human small resistance-like coronary arteries.  
Br J Pharmacol 120(5):757-62, 1997.
- 105 Kemp BK, Smolich JJ, Cocks TM:**  
Evidence for specific regional patterns of responses to different vasoconstrictors and vasodilators in sheep isolated pulmonary arteries and veins.  
Br J Pharmacol 121(3):441-50, 1997.
- 106 King LS, Fukushima M, Banerjee M, Kang KH, Newman JH, Biaggioni I:**  
Pulmonary vascular effects of prostaglandin D<sub>2</sub>, but not its systemic vascular or airway effects, are mediated through thromboxane receptor activation.  
Circ Res 68(2):352-8, 1991.
- 107 Korbut R, Boyd J, Eling T:**  
Prostacyclin and thromboxan A<sub>2</sub> release in isolated rat lungs.  
Prostaglandins 23(1):67-75, 1982.
- 108 Lach E, Trifilieff A, Mousli M, Landry Y, Gies JP:**  
Bradykinin-induced contraction of guinea pig lung in vitro.  
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 350(2):201-208, 1994.
- 109 Lal H, Woodward B, Williams KI:**  
Differential effects of agents on bronchial and vascular tone and lung weight in the rat isolated perfused lung.  
Pulm Pharmacol 7(4):271-8, 1994.
- 110 Lewis AJ, Furst DW (eds.):**  
Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. Mechanisms and Clinical Use.  
New York, Marcel Dekker, 1987.
- 111 Lewis K, Cadieux A, Rae GA, D'Orleans-Juste P:**  
L-NAME potentiates endothelin-stimulated thromboxane release from guinea pig lung.  
J Cardiovas Pharmacol 31 (Suppl 1): S109-11, 1998.
- 112 Lewis K, Cadieux A, Rae GA, Gratton JP, D'Orleans-Juste P:**  
Nitric oxide limits the eicosanoid-dependent bronchoconstriction and hypotension induced by endothelin-1 in the guinea-pig.  
Br J Pharmacol 126(1):93-102, 1999.
- 113 Lewis K, D'Orleans-Juste P, Benckroun MT, Fournier A, Cadieux A:**  
Effect of neuropeptide Y on bradykinin-induced release of prostacyclin and thromboxane from guinea pig perfused lung.  
Can J Physiol Pharmacol 75(6):677-82, 1997.
- 114 Linz W, Martorana PA, Schölkens B:**  
Local inhibition of bradykinin degradation in ischemic hearts.  
J Cardiovasc Pharmacol 15 (Suppl 6):S99-109, 1990.
- 115 Linz W, Schölkens BA:**  
Role of bradykinin in the cardiac effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors.  
J Cardiovasc Pharmacol 20 (Suppl 9):S83-90, 1992.



- 
- 116 Linz W, Wiemer G, Scholkens BA:**  
Contribution of bradykinin to the cardiovascular effects of ramipril.  
J Cardiovasc Pharmacol 22 (Suppl 9):S1-8, 1992.
- 117 Lipton HL, Nandiwada PA, Hyman AL, Kadowitz PJ:**  
Influence of cyclooxygenase blockade on responses to isoproterenol, bradykinin and nitroglycerin in the feline pulmonary vascular bed.  
Prostaglandins 28(2):253-70, 1984.
- 118 Luscher TF:**  
Angiotensin, ACE-inhibitors and endothelial control of vasomotor tone.  
Basic Res Cardiol 88 (Suppl 1):15-24, 1993.
- 119 Mak JC, Barnes PJ:**  
Autoradiographic visualization of bradykinin receptors in human and guinea pig lung.  
Eur J Pharmacol 194(1):37-43, 1991.
- 120 Marceau F, Lussier A, Regoli D, Girouard JP:**  
Pharmacology of kinins: their relevance to tissue injury and inflammation.  
Gen Pharmacol 14:209-229, 1983.
- 121 Marin J, Sanchez-Ferrer CF:**  
Role of endothelium-formed nitric oxide on vascular response.  
Gen Pharmacol 21(5):575-87, 1990.
- 122 Marsault R, Illiano S, Vanhoutte PM:**  
Bradykinin-induced contractions of canine saphenous veins: mediation by B<sub>2</sub> receptors and involvement of eicosanoids.  
Br J Pharmacol 120(2):215-20, 1997.
- 123 Mathe AA, Hedqvist P, Strandberg K, Leslie CA:**  
Aspects of prostaglandin function in the lung.  
N Eng J Med 296:850-55, 910-14, 1977.
- 124 Max M, Rossaint R:**  
Inhaled prostacyclin in the treatment of pulmonary hypertension.  
Eur J Pediatr, 158 Suppl 1:S23-6, 1999.
- 125 McGiff JC, Itskovitz HD, Terragno A, Wong YK:**  
Modulation and mediation of the actions of the renal kallikrein-kinin system by prostaglandins.  
Fed Proc 35:175-180, 1976.
- 126 McMahon TJ, Hood JS, Bellan JA, Kadowitz PJ:**  
N-omega-nitro-L-arginine methyl ester selectively inhibits pulmonary vasodilator responses to acetylcholin and bradykinin.  
J Appl Physiol 71(5):2026-31, 1991.
- 127 Menconi M, Hahn G, Polgar P:**  
Prostaglandin synthesis by cells comprising the calf pulmonary artery.  
J Cell Physiol 120(2):163-8, 1984.

- 128 Mombouli JV, Vanhoutte PM:**  
Heterogeneity of endothelium-dependent vasodilator effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors: role of bradykinin generation during ACE inhibition.  
*J Cardiovasc Pharmacol* 20 (Suppl 9):S74-82, 1992.
- 129 Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR:**  
An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation.  
*Nature* 263:663-65, 1976.
- 130 Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA:**  
Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology.  
*Pharmacol Rev* 43(2):109-42, 1991.
- 131 Moncada S, Vane JR:**  
Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin.  
*Pharmacol Rev* 30:293-331, 1979.
- 132 Nakamura F, Minshall RD, Le Breton GC, Rabito SF:**  
Thromboxane A<sub>2</sub> mediates the stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate production and intracellular calcium mobilization by bradykinin in neonatal rat ventricular cardiomyocytes.  
*Hypertension* 28(3):444-9, 1996.
- 133 Nakanishi S:**  
Substance P precursor and kininogen: their structures, gene organizations, and regulation.  
*Physiol Rev* 67:1117-42, 1987.
- 134 Nasjletti A, Malik KU:**  
Relationship between the kallikrein-kinin and prostaglandin systems.  
*Life Sciences* 25: 99-110, 1979.
- 135 Needleman P, Turk J, Jaschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB:**  
Arachidonic acid metabolism.  
*Annu Rev Biochem* 55:69-102, 1986.
- 136 Nishiwaki K, Nyhan DP, Rock P, Desai PM, Peterson WP, Pribble CG, Murray PA:**  
N-omega-nitro-L-arginine and pulmonary vascular pressure-flow relationship in conscious dogs.  
*Am J Physiol* 265(5 Pt 2):H1331-7, 1992.
- 137 Noll G, Buhler FR, Yang Z, Luscher TF:**  
Different potency of endothelium derived relaxing factors against thromboxane, endothelin, and potassium chloride in intramyocardial porcine coronary arteries.  
*J Cardiovas Pharmacol* 18(1):120-6, 1991.
- 138 Nolly H, Carretero OA, Scicli AG:**  
Kallikrein release by vascular tissue.  
*Am J Physiol* 265:H1209-14, 1993.

- 139 Nossaman BD, Feng CJ, Kadowitz PJ:**  
Analysis of responses to bradykinin and influence of HOE 140 in the isolated perfused rat lung.  
Am J Physiol 266(6 Pt 2):H2452-61, 1994.
- 140 O'Keefe EH, Lin EC, Greenberg R, Ogletree ML:**  
Effects of a thromboxane synthetase inhibitor and a thromboxane antagonist on release and activity of thromboxane A<sub>2</sub> and prostacyclin in vitro.  
Prostaglandins 29(5):785-97, 1985.
- 141 Oka M, Hasunuma K, Webb SA, Stelzner TJ, Rodman DM, McMurtry IF:**  
EDRF suppresses an unidentified vasoconstrictor mechanism in hypertensive rat lungs.  
Am J Physiol 264(6 Pt 1):587-97, 1993.
- 142 Okazaki T, Sagawa N, Okita JR, Bleasdale JE, MacDonald PC, Johnston JM:**  
Diacylglycerol metabolism and arachidonic acid release in human fetal membranes and decidua vera.  
J Biol Chem 256:7316-7321, 1981.
- 143 Palmer RMJ, Feridge AG, Moncada:**  
Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor.  
Nature (Lond) 327:525-26, 1987.
- 144 Pellacani A, Brunner HR, Nussberger J:**  
Antagonizing and measurement: approaches to understanding of hemodynamic effects of kinins.  
J Cardiovasc Pharmacol 20 Suppl 9:S28-34, 1992.
- 145 Perrella MA, Edell ES, Krowka MJ, Cortese DA, Burnett JC Jr:**  
Endothelium-derived relaxing factor in pulmonary and renal circulations during hypoxia.  
Am J Physiol; 263 (1 Pt 2):R45-50, 1992.
- 146 Persson K, Andersson RG:**  
Biphasic response to bradykinin in isolated porcine iliac arteries is mediated by bradykinin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> receptors.  
J Cardiovasc Pharmacol 31(2):306-13, 1998.
- 147 Persson MG, Gustafsson LE, Wiklund NP, Moncada S, Hedqvist P:**  
Endogenous nitric oxide as a probable modulator of pulmonary circulation and hypoxic pressor response in vivo.  
Acta Physiol Scand 140(4):449-57, 1990.
- 148 Piper PJ, Vane JR:**  
The release of prostaglandins from lung and other tissues.  
Ann N Y Acad Sci 180:363-85, 1971.
- 149 Pizard A, Blaukat A, Müller-Esterl W, Alhenc-Gelas F, Rajerison RM:**  
Bradykinin-induced internalization of the human B<sub>2</sub> receptor requires phosphorylation of three serine and two threonine residues at its carboxy tail.  
J Biol Chem 274(18):12738-47, 1999.

- 150 Puustinen T, Uotila P:**  
The effect of bradykinin, histamine, leukotrienes B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> and D<sub>4</sub> on the formation of 6-keto-PGF<sub>1α</sub> and thromboxane B<sub>2</sub> in hamster lungs.  
Prostaglandins Leukot Med 12(4):443-8, 1983.
- 151 Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S:**  
Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo.  
Br J Pharmacol 101(3):746-52, 1990.
- 152 Regoli D, Barabé J:**  
Pharmacology of bradykinin and related kinins.  
Pharmacol Rev 32:1-46, 1980.
- 153 Regoli D, Gobeil F, Nguyen QT, Jukic D, Seoane PR, Salvine JM:**  
Bradykinin receptor types and B<sub>2</sub> subtypes.  
Life Sci 55(10):735-49, 1994.
- 154 Regoli D, Jukic D, Gobeil F, Rhaleb NE:**  
Receptors for bradykinin and related kinins: a critical analysis.  
Can J Physiol Pharmacol 71:556-567, 1993.
- 155 Remuzzi G, FitzGerald GA, Patrono C:**  
Thromboxane synthesis and action within the kidney.  
Kidney Int 41:1483-93, 1992.
- 156 Resende AC, Ballejo G, Salgado MC:**  
Role of non-nitric oxide non-prostaglandin endothelium-derived relaxing factor(s) in bradykinin vasodilation.  
Braz J Med Biol Res 31(9):1229-35, 1998.
- 157 Ridings PC, Blocher CR, Fisher BJ, Fowler AA 3<sup>rd</sup>, Sugerman HJ:**  
Beneficial effects of a bradykinin antagonist in a model of gram-negative sepsis.  
J Trauma 39(1):81-8, 1995.
- 158 Roberts RA:**  
Bradykinin receptors: characterization, distribution and mechanisms of signal transduction.  
Prog Growth Factors Res 1:237-252, 1998.
- 159 Russell PC, Emery CJ, Cai YN, Barer GR, Howard P:**  
Enhanced reactivity to bradykinin, angiotensin I and the effect of captopril in the pulmonary vasculature of chronically hypoxic rats.  
Eur Respir J 3(7):779-85, 1990.
- 160 Ryan JW:**  
Processing of the endogenous polypeptides by the lungs.  
Annu Rev Physiol 44:241-255, 1982.
- 161 Ryrfeldt A, Olafsdottir K, Berggren M, Moldeus P:**  
Effects of some autacoids on breathing and perfusion flow in the isolated perfused rat lung.  
Pharmacol Toxicol 66(4):312-4, 1990.

- 162 Sai Y, Okamura T, Amakata Y, Toda N:**  
Comparison of responses of canine pulmonary artery and vein to angiotensin II, bradykinin and vasopressin.  
Eur J Pharmacol 282(1-3):235-41, 1995.
- 163 Saldeen P, Saldeen T:**  
6-keto-Prostaglandin F1 alpha / thromboxane B<sub>2</sub> ratio in vascular and lung tissue.  
Throm Res 30(6):643-50, 1983.
- 164 Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN:**  
Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects.  
Science 237:1171-76, 1987.
- 165 Saussy DL Jr, Mais DE, Dube GP, Magee DE, Brune KA, Kurtz WL, Williams CM:**  
Characterization of a thromboxane A<sub>2</sub> / prostaglandin H<sub>2</sub> receptor in guinea pig lung membranes using a radioiodinated thromboxane mimetic.  
Mol Pharmacol 39(1):72-8, 1991.
- 166 Schilling WP, Ritchie AK, Navarro LT, Eskin SG:**  
Bradykinin-stimulated calcium influx in cultured bovine aortic endothelial cells.  
Am J Physiol 255(2 Pt 2):H219-27, 1988.
- 167 Scholkens BA, Linz W, Martorana PA:**  
Experimental cardiovascular benefits of angiotensin-converting enzyme inhibitors: beyond blood pressure reduction.  
J Cardiovasc Pharmacol 18:S26-30, 1991.
- 168 Scicli AG:**  
Increases in cardiac kinins as a new mechanism to protect the heart.  
Hypertension 23:419-21, 1994.
- 169 Seeger W, Neuhof H, Graubert E, Wolf H, Roka L:**  
Comparative influence of the Ca-ionophore A 23187, bradykinin, kallidin and eledoisin on the rabbit pulmonary vasculature with special reference to arachidonate metabolism.  
Adv Exp Med Biol 156:533-51, 1983.
- 170 Shore SA, Stimler-Gerard NP, Smith E, Drazen JM**  
A formyl peptide contrasts guinea pig lung: role of arachidonic acid metabolites.  
J Appl Physiol 63(6):2450-9, 1987.
- 171 Sigal E:**  
The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism.  
Am J Physiol 260:L13-28, 1991.
- 172 Smith WL:**  
Prostanoid biosynthesis and mechanism of action.  
Am J Physiol 268:F181-91, 1992.
- 173 Southan GJ, Zingarelli B, O'Connor M, Salzman AL, Szabo C:**  
Spontaneous rearrangement of aminoalkylisothioureas into mercaptoalkylguanidines, a novel class of nitric oxide synthase inhibitors with selectivity towards the inducible isoform.  
Br J Pharmacol 117:619-32, 1996.

- 174 Sprague RS, Stephenson AH, Dimmitt RA, Weintraub NL, Branch CA, McMurdo L, Lonigro AJ:**  
Effect of L-NAME on pressure-flow relationships in isolated rabbit lungs: role of red blood cells.  
Am J Physiol 269(6 Pt 2):H1941-8, 1995.
- 175 Sprague RS, Stephenson AH, Dimmitt RA, Weintraub NL, Branch CA, McMurdo L, Lonigro AJ:**  
Inhibition of nitric oxide synthesis results in a selective increase in arterial resistance in rabbit lungs.  
Pol J Pharmacol 46(6):579-85, 1994.
- 176 Sprague RS, Thiernemann C, Vane JR:**  
Endogenous endothelium-derived relaxing factor opposes hypoxic pulmonary vasoconstriction and supports blood flow to hypoxic alveoli in anesthetized rabbits.  
Proc Natl Acad Sci USA 89(18):8711-5, 1992.
- 177 Stamler JS, Loh E, Roddy MA, Currie KE, Creager MA:**  
Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans.  
Circulation 89(5):2035-40, 1994.
- 178 Theis JG, Toyoda O, Cocceani F:**  
Effect of endothelium removal on prostaglandin and nitric oxide function in pulmonary resistance arteries in the lamb.  
Can J Physiol Pharmacol 76(2):182-7, 1998.
- 179 Toda N, Bian K, Akiba T, Okamura T:**  
Heterogeneity in mechanisms of bradykinin action in canine isolated blood vessels.  
Eur J Pharmacol 135(3):321-9, 1987.
- 180 Trifilieff A, Haddad EB, Landry Y, Gies JP:**  
Evidence for two high-affinity bradykinin binding sites in the guinea-pig lung.  
European Journal of Pharmacology – Molecular Pharmacology Section 207:129-134, 1991.
- 181 Uedelhoven WM, Meese CO, Weber PC:**  
Analysis of the major urinary thromboxane metabolites, 2,3-dinor-thromboxane B<sub>2</sub> and 11-dehydrothromboxane B<sub>2</sub> by gas chromatography – mass spectrometry and gas chromatography – tandem mass spectrometry.  
J Chromatogr 497:1-16, 1989.
- 182 Uncles DR, Daugherty MO, Frank DU, Roos CM, Rich GF:**  
Nitric oxide modulation of pulmonary vascular resistance is red blood cell dependent in isolated rat lungs.  
Anaesth Analg 83(6):1212-7, 1996.
- 183 Vane JR, Anggard EE, Botting RM:**  
Regulatory functions of the vascular endothelium.  
N Engl J Med 323:27-36, 1990.
- 184 Vane JR, Ferreira SH:**  
Interactions between bradykinin and prostaglandins.  
In: Fogarty international Center Proceedings, vol. 27, eds JJ Pisano and KF Austen. Washington: 255-66, 1976.

- 185 Vavrek RJ, Stewart JM:**  
Competitive antagonists of bradykinin.  
Peptides 6:161-164, 1985.
- 186 Voelkel NF, Gerber JG, McMurtry IF, Nies AS, Reeves JT:**  
Release of vasodilator prostaglandin, PGI<sub>2</sub>, from isolated rat lung during vasoconstriction.  
Circ Res 48(2):207-13, 1981.
- 187 Walmrath D, Schermuly R, Pilch J, Grimminger F, Seeger W:**  
Effects of inhaled versus intravenous vasodilators in experimental pulmonary hypertension.  
Eur Respir J 10(5):1084-92, 1997.
- 188 Wang YX, Gavras I, Wierzbza T, Lammek B, Gavras H:**  
Inhibition of nitric oxide, bradykinin, and prostaglandins in normal rats.  
Hypertension 19(2 Suppl):II255-61, 1992.
- 189 Wassdal I, Nicolaysen G, Iversen JG:**  
Mechanisms of the relaxant and contractile responses to bradykinin in rat duodenum.  
Acta Physiol Scand 165(3):271-6, 1999.
- 190 Weinberg ML, Moreira E, Weinberg J:**  
Arachidonic acid products-mediated contraction induced by bradykinin in relaxed mesenteric arterial rings from Holtzman rats.  
Eur J Pharmacol 320(2-3):145-50, 1997.
- 191 Weintraub NL, Joshi SN, Branch CA, Stephenson AH, Sprague RS, Lonigro AJ:**  
Relaxation of porcine coronary artery to bradykinin. Role of arachidonic acid.  
Hypertension 23(6 Pt 2):976-81, 1994.
- 192 Wescott J:**  
Analysis of 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, 5-HETE, and LTC<sub>4</sub> in rat lung: Comparison of GC/MS, RIA and EIA.  
Prostaglandins 32:857-73, 1986.
- 193 Whittle BJ, Lopez-Belmonte J, Rees DD:**  
Modulation of the vasodepressor actions of acetylcholin, bradykinin, substance P and endothelin in the rat by a specific inhibitor of nitric oxide formation.  
Br J Pharmacol 98(2):646-52, 1989.
- 194 Whorton AR, Young SL, Data JL, Barchowsk A, Kent RS:**  
Mechanism of bradykinin-stimulated prostacyclin synthesis in porcine aortic endothelial cells.  
Biochim Biophys Acta 712(1):79-87, 1982.
- 195 Wiemer G, Scholkens BA, Becker RH, Busse R:**  
Ramiprilat enhances endothelial autacoid formation by inhibiting breakdown of endothelium-derived bradykinin.  
Hypertension 18(4):558-63, 1991.
- 196 Wilson PS, Thompson WJ, Moore TM, Khimenko PL, Taylor AE:**  
Vasoconstriction increases pulmonary nitric oxide synthesis and circulating cyclic GMP.  
J Surg Res 70(1):75-83, 1997.

- 197 Wirth KF, Hock FJ, Albus U, Linz W, Alpermann HG, Anagnostopoulos H, Henke SS, Breipohl G, König W, Knolle J, Schölkens BA:**  
HOE 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist; in vivo studies.  
Br J Pharmacol 102:774-77, 1991.
- 198 Wright JK, Kim LT, Rogers TE, Nguyen H, Turnage RH:**  
Nitric oxide and thromboxane A<sub>2</sub>-mediated pulmonary microvascular dysfunction.  
Arch Surg 134(3):293-8, 1999.
- 199 Yang HY, Erdos EG, Levin Y:**  
A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin.  
Biochimica et Biophysica Acta 214:374-376, 1970.
- 200 Yen MH, Yang JH, Sheu JR, Lee YM, Ding YA:**  
Chronic exercise enhances endothelium-mediated dilation in spontaneously hypertensive rats.  
Life Sci 57(24):2205-13, 1995.
- 201 Zhang H, Gaginella TS, Chen X, Cornwell DG:**  
Action of bradykinin at the cyclooxygenase step in prostanoid synthesis through the arachidonic acid cascade.  
Agents and Actions 34(3-4):397-404, 1991.
- 202 Zhang H, Kaseki H, Davis WB, Whisler RL, Cornwell DG:**  
Mechanisms for the stimulation of prostanoid synthesis by cyclosporine A and bacterial lipopolysaccharide.  
Transplantation 47:864-71, 1989.
- 203 Tschöpe C, Heringer-Walther S, Walther T:**  
Regulation of the kinin receptors after induction of myocardial infarction: a mini-review.  
Braz J Med Biol Res 33(6): 701-708, 2000.
- 204 Miller DH, Margolius HS:**  
The kallikrein-kinin-kininogen system, in Principals of Medical Biology.  
Molecular and Cellular Pharmacology 8B: 363-84, 1997.
- 205 Morinelli TA, Webb JG, Jaffa AA, Privitera PJ, Margolius HS:**  
A metabolic fragment of bradykinin, Arg-Pro-Pro-Gly-Phe, protects against the deleterious effects of lipopolysaccharide in rats.  
J Pharmacol Exp Ther 296:71-76, 2001.
- 206 Hirayama Y, Kayakiri H:**  
Bradykinin antagonists: current status and perspective, abstract.  
Nippon Yakurigaku Zasshi 119(1):45-53, 2002.
- 207 Heitsch H:**  
Non-peptide antagonists and agonists of the bradykinin B<sub>2</sub>-receptor.  
Curr Med Chem 9(9): 913-28, 2002.
- 208 Yekebas E, Treede H, Jochum M, Gippner-Steppert C, Bloechle C, Knoefel WT, Scholz J, Fink E, Izbicki JR:**  
Bradykinin B<sub>2</sub>-receptor antagonism attenuates fatal cardiocirculatory breakdown induced by severe experimental pancreatitis.  
Crit Care Med 28(4): 1119-27, 2000.



- 
- 209 Colman RW, Schmaier AH:**  
Contact System: A vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes.  
Blood 90(10): 3819-43, 1997.
- 210 Chavakis T, Boeckel N, Santoso S, Voss R, Isordia-Salas I, Pixley RA, Morgenstern E, Colman RW, Preissner KT:**  
Inhibition of platelet adhesion and aggregation by a defined region (Gly-486-Lys-502) of high molecular weight kininogen.  
J Biol Chem 277(26): 23157-64, 2002.

# **LEBENS LAUF**

## **Markus Strauf**

### **PERSÖNLICHE DATEN**

geboren am	20.08.1972
in	Giessen
Eltern	Wilhelm und Hilde Strauf, geb. Klingelhöfer
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### **AUSBILDUNGSDATEN**

1979 – 1989	Grundschule, Förderstufe und gymnasialer Zweig der Brüder-Grimm-Schule in Giessen
1989 – 1992	Gymnasium der Liebigschule in Giessen Abschluß: Abitur
1992 – 1998	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Giessen Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung im November 1998
Januar 1999 – Juni 2000	AiP im Krankenhaus der Barmherzigen Brüder in Regensburg in der Abteilung Neurologie
September 2000	Ärztliche Approbation
Juli – Oktober 2000	Fertigstellung der Dissertation im Fachgebiet Pathophysiologie an der Justus-Liebig-Universität Giessen, Medizinische Klinik I, Klinische Pathophysiologie und Experimentelle Medizin
seit November 2000	Assistenzarzt im Zentrum für Innere Medizin im Klinikum Passau 11/00 – 01/02: Abteilung für Hämatologie / Onkologie seit 01/02: Abteilung für Gastroenterologie und Allgemeine Innere Medizin

## **DANKSAGUNG**

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. H. Neuhof für die Überlassung des Dissertationsthemas, der konstruktiven Betreuung und wertvollen Unterstützung sowie der Möglichkeit zum experimentellen, wissenschaftlichen Arbeiten.

Herzlich danken möchte ich auch Frau Dr. med. Ch. Neuhof für die anregenden Diskussionen sowie insbesondere für die Posterpräsentation von Teilen dieser Arbeit auf der „Kinin`98“ in Tokyo, Japan.

Insbesondere gilt mein Dank der jederzeit freundlichen und herzlichen Begleitung durch Herrn Professor und Frau Dr. Neuhof während der Erstellung dieser Dissertation.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei den Mitarbeitern der Abteilung für Klinische Pathophysiologie und Experimentelle Medizin am Zentrum für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen, namentlich Frau A. Weber für die engagierte Hilfe bei der Durchführung der Proben-Analysen, Herrn H. Michnacs für die technische Unterstützung insbesondere bei den Organpräparationen sowie Frau T. Wieth für die hilfreiche Mitwirkung bei der Literaturrecherche.